

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-505988

(43) 公表日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 2 3 L 1/236		9358-4B	A 2 3 L 1/236 A
C 0 7 K 14/405		9356-4H	C 0 7 K 14/405
C 1 2 P 19/02		7432-4B	C 1 2 P 19/02
// C 1 2 N 9/88		9152-4B	C 1 2 N 9/88

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 164 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-511303  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)10月15日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)4月15日  
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 4 / 0 3 3 9 7  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 1 0 6 1 6  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)4月20日  
 (31) 優先権主張番号 9 3 2 1 3 0 1 . 5  
 (32) 優先日 1993年10月15日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)  
 (31) 優先権主張番号 9 3 2 1 3 0 2 . 3  
 (32) 優先日 1993年10月15日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 ダニスコ エイ/エス  
 デンマーク国 コペンハーゲン ケイ デ  
 ィーケー-1001, ビー. オー. ボックス  
 17, ランゲプロガード 1  
 (72) 発明者 ユ, シュークン  
 スウェーデン国 マルモ エス-212 40,  
 グナー ヘジデマンス ガータ 29  
 (72) 発明者 ボジュセン, カーステン  
 デンマーク国 アレロッド ディーケー-  
 3450, フビデフスベ 13  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 5-D-アンヒドロフルクトース調製のための $\alpha$ -1, 4-グルカンリアーゼの使用

## (57) 【要約】

糖1, 5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法が記載される。この方法は、 $\alpha$ -1, 4-グルカン、 $\alpha$ -1, 4-グルカンリアーゼで処理する工程を包含する。ここで、この酵素は実質的に純粋な形態で使用される。好ましい実施態様において、グルカンが、 $\alpha$ -1, 4-結合以外の結合および $\alpha$ -1, 4-結合に加えて結合を含有する場合、 $\alpha$ -1, 4-グルカンリアーゼが、他の結合を破壊し得る適切な試薬と協同して使用される。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1.  $\alpha$ -1,4-グルカンを酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼで処理する工程を包含する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法であって、該酵素が実質的に純粋な形態で使用されることを特徴とする方法。
2. 前記グルカンが前記 $\alpha$ -1,4-結合以外の結合および $\alpha$ -1,4-結合に加えて結合を含有する場合、前記 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼが他の結合を破壊し得る適切な試薬と協同して使用される、請求項1に記載の方法。
3. 前記グルカンがデンプンであり、かつヒドロラーゼ、好ましくはグルカノヒドロラーゼが前記 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼと協同して使用される、請求項2に記載の方法。
4. 前記ヒドロラーゼが、プルラーゼまたはイソアミラーゼの少なくとも1つである、請求項2または請求項3に記載の方法。
5. 前記 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼが、支持体に結合しているか、より好ましくは溶解された形態である、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. 前記酵素が、菌類、好ましくは*Morchella costata*または*Morchella vulgaris*から、または菌類感染藻類、好ましくは*Gracilariopsis lemaneiformis*から、または藻類単独、好ましくは*Gracilariopsis lemaneiformis*からのいずれかで単離される、請求項1から5のいずれかに記載の方法。
7. 前記酵素が、菌類から、または菌類感染藻類から、または藻類単独から、該酵素によって分解されないゲルを使用して単離および／またはさらに精製される、請求項6に記載の方法。
8. 前記ゲルが、デキストリンまたはその誘導体に基づく、好ましくは該ゲルがシクロデキストリンである、より好ましくは $\beta$ -シクロデキストリンである、請求項7に記載の方法。
9. 前記酵素が、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列あるいはそれらの任意の変異体を含む、請求項1から8のいずれかに記載の方法。
10. 前記酵素が、該酵素をコードするヌクレオチド配列を発現させることによ

り得られる、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

11. 前記ヌクレオチド配列が、DNA配列である、請求項10に記載の方法。

12. 前記DNA配列が、配列番号3、または配列番号4、または配列番号7、または配列番号8の任意のDNA配列に同一な、または相補的な、または実質的に相同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を含む、請求項11に記載の方法。

13. 前記デンプンが、高濃度で使用される、例えば約25%までの溶液で使用される、請求項3から12のいずれかに記載の方法。

14. 前記基質が、緩衝液の存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項1から13のいずれかに記載の方法。

15. 前記基質が、少なくとも実質的に純粋な水の存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項1から13のいずれかに記載の方法。

16. 前記基質が、補因子の非存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項1から15のいずれかに記載の方法。

17. 前記酵素が、アミロペクチンまたはデキストリンと組み合わせて使用される、請求項1から16のいずれかに記載の方法。

18.  $\alpha$ -1,4-グルカンを酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼで処理する工程を包含する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法であって、該酵素が、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列、あるいはその任意の変異体を含むことを特徴とする方法。

19. 本発明の方法で調製される、糖1,5-D-アンヒドロフルクトース。

20. 反応媒体の疎水性を増加させて、GL酵素の安定性および活性を増加させ得る、試薬の使用。

21. 抗酸化剤としてのAFの使用。

22. 甘味料としてのAFの使用。

## 【発明の詳細な説明】

1,5-D-アンヒドロフルクトース調製のための $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの使用

本発明は酵素、特に $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ(「GL」)の使用に関し、 $\alpha$ -1,4-グルカン为基础とした基質から1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)を調製する。

本発明は糖、特に1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)を、抗酸化剤として、特に食料品および飲料の抗酸化剤として使用することにも関する。

本発明は1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)の甘味料として、特に食料品および飲料の甘味料として、好ましくはヒトの食料品および飲料としての使用に関する。

FR-A-2617502およびBauteら、(Phytochemistry (1988) vol.27 No.11 pp3401-3403)はMorchellia vulgarisにおける1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)の見かけの酵素反応による産生について報告している。このAFの生産量は非常に少ない。可能な酵素反応に言及しているのにもかかわらず、これらの2つの文献は、塩基配列の情報はもちろんのこと、いかなる酵素についてのアミノ酸配列も示していない。これらの文献は、AFが抗生物質ピロンミクロテシン(pyronomicin)の調製のための前駆体になり得ることを報告する。

Yuら、(Biochimica et Biophysica Acta (1993) vol 1156 pp313-320)は紅海藻からのGLの調製およびAFを生産するために $\alpha$ -1,4-グルカンを分解するGLの使用について報告している。このAFの生産量は非常に少ない。GL酵素に言及するのにも関わらず、この文献は同酵素をコードする塩基配列の情報はもちろんのことその酵素についてのいかなるアミノ酸配列データも示していない。この文献はGLの供給源は藻類であることも示唆している。

代表的な $\alpha$ -1,4-グルカン为基础とした基質はデンプンである。今日、デンプンは工業における広い使用を見出している。これは主にこれらが安価な原材料であるからである。

デンプン分解酵素は種々のカテゴリーに分類し得る。デンプンヒドロラーゼは

グルコースまたはグルコースオリゴマーを生成する。デンプン分解酵素の第二の群は、無機リン酸の存在下でデンプンからグルコース-1-リン酸を生成するホスホリラーゼである。

AFはまた、化学的に合成されてきた (Tetrahedron Letters Vol 21 pp1429-1432のLichtenthalerの研究を参照のこと)。しかし、この化学的合成には多くの数の工程が含まれ、そして多量のAFを生成させない。

AFを生成させるこの化学的合成経路は、それゆえ大変高価である。

それゆえ、安価でかつ容易な方法、ならびに多量のAFを生成し得る方法でAFを調製し得るプロセスが必要である。

さらに、抗酸化剤は代表的には、食料品などの物質に酸素がいかなる有害な影響を及ぼすことも防止するために使用される。一般的に使用される2つの抗酸化剤は、GRINDOX 142およびGRINDOX 1029である。これらの抗酸化剤は多くの成分を含み、そして製造するには非常に高価である。

それゆえ、より単純でより安価な形態の抗酸化剤を有する必要がある。

さらに、甘味料はしばしば食料品および飲料の調製に使用される。しかし、多くの甘味料は高価であり、調製が複雑である。

それゆえ、より単純でより安価な形態の甘味料を有する必要がある。

本発明では、 $\alpha$ -1,4-グルカン<sub>1</sub>を酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼで処理する工程を包含する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法を提供する。ここでこの方法は、酵素が実質的に純粋な形態で使用されることにより特徴付けられる。

好ましくは、グルカンが $\alpha$ -1,4-結合以外の結合、および $\alpha$ -1,4-結合に加えて結合を含有する場合、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを、他の結合を破壊し得る適切な試薬 (ヒドロラーゼ、好ましくはグルカノヒドロラーゼなど) と協同して使用する。

好ましくは、グルカンは、デンプンあるいは化学的または酵素的に調製されるデンプン画分である。酵素的に調製される場合は、反応は $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを添加する前に行われ得るか、または反応は同時に行われ得る。適切な試薬は、補助酵素 (auxiliary enzyme) であり得る。好ましい補助酵素は $\alpha$ -または $\beta$ -アミラーゼである。好ましくは、脱分枝酵素が使用される。より好ましくは補助

酵素はプルラーゼ (pullanase) またはイソアミラーゼの少なくとも 1 つである。

好ましくは、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは支持体に結合しているか、より好ましくは、不溶性の形態である。

好ましくは、酵素は菌類 (好ましくは、*Morchella costata* または *Morchella vulgaris*) から、または菌類感染藻類 (好ましくは、*Gracilariopsis lemaneiformis*) から、あるいは藻類単独 (好ましくは *Gracilariopsis lemaneiformis*) からのいずれかで単離される。

好ましくは、酵素は菌類から、または菌類感染藻類から、あるいは藻類単独から、この酵素によって分解されないゲルを使用して、単離および/または精製される。

好ましくは、ゲルはデキストリンまたはその誘導体に基づく。

好ましくは、ゲルはシクロデキストリン、より好ましくは、 $\beta$ -シクロデキストリンである。

好ましくは、酵素は配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 6 のアミノ酸配列あるいはそれらの任意の変異体を含む。

別の好ましい実施態様では、酵素は配列番号 9 ~ 11 のいずれかに示したアミノ酸配列またはその任意の変異体を含む。

用語「その任意の変異体」は、その結果として生じる酵素がリアーゼ活性を有するという条件で、配列からの、あるいは配列に対しての、任意の少なくとも 1 アミノ酸の置換、多様性、修飾、置き換え、欠失、または付加を意味する。

好ましくは、酵素はアミロペクチンまたはデキストリンと組み合わせて使用される。

好ましくは、酵素はこの酵素をコードするヌクレオチド配列の発現から得られる。

好ましくはヌクレオチド配列は DNA 配列である。

好ましくは DNA 配列は、配列番号 3、または配列番号 4、または配列番号 7、または配列番号 8 のいずれかの DNA 配列に同一、または相補的、または実質的相

同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を含む。

別の好ましい実施態様では、DNA配列は、配列番号12~14に示す配列に同一、または相補的、または実質的相同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む、任意の配列を含む。

表現「実質的相同性」は、構造および／またはヌクレオチド成分および／または生物学的活性に関しての相同性を含有する。

表現「任意の適正なコドン置換を含む」は、生じる酵素がリアーゼ活性を有するという条件で、同じアミノ酸をコードする他のコドンとの任意のコドンの置き換えまたは置換、あるいはコドンの任意の付加または削除を包含する。

他の言葉で言えば、本発明はまた、その中で少なくとも1ヌクレオチドが欠失、置換または修飾される、あるいはその中で付加的な少なくとも1ヌクレオチドが挿入され、グルカンリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、修飾されたDNA配列を含有する。好ましくは酵素は、増加したリアーゼ活性を有する。

好ましくは、デンプンは（例えば、約25%溶液までの）高濃度で使用する。

好ましくは、基質を緩衝液の存在下で酵素を用いて処理する。

より好ましくは、基質を実質的に純粋な水の存在下で酵素を用いて処理する。

好ましくは、基質を補因子の非存在で酵素を用いて処理する。

本発明では、 $\alpha$ -1,4-グルカンを酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼで処理する工程を含有する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法も提供する。ここでこの方法は、酵素が配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列、または配列番号9~11のアミノ酸配列のいずれか、あるいはその任意の変異体を含むことを特徴とする。

本発明では、本発明の方法によって調製される場合の糖1,5-D-アンヒドロフルクトースも提供される。

本発明の方法によって調製されたAFは、 $^{13}\text{C}$  NMRにより確認され、特徴付けられた。

本発明の方法の一つの鍵となる有利性は、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースを、従来よりずっと大量に、および既知のプロセスよりも比較的容易かつ安価な方

## 法

で調製し得るということである。例えば、糖は今やほんのごくわずかな量（例えば、マイクログラム量）しか生成され得なかった先行技術の方法に比べて、例えば、100g以上（例えば、500g）の収量で調製され得る。

GLにより触媒され得る代表的な反応は以下のように要約される：

1). アミロペクチン-----→ AF + 限界デキストリン

2). アミロース-----→ AF + 限界デキストリン

3). デキストリン-----→ AF + グルコース

反応1)では、2つの生成物の比率はアミロペクチンの構造あるいは $\alpha$ -1,6-グルコシド結合のアミロペクチン分子中の分布に依存する。

反応2)および3)では、生成物の比率は基質の重合度(DP)数に依存する。反応3では、AFとグルコースとの間の比率はDPに依存する。例えば、デキストリンが10グルコース単位を含有する場合、AF:グルコース比は9:1である。

本発明の別の有利性は、 $\alpha$ -1,4-結合以外の結合を含むグルカンが、実質的に分解され得ることである（従来は、一部のみの分解が達成された）。1,5-D-アンヒドロフルクトース前駆体の実質的な分解は1,5-D-アンヒドロフルクトースの収量を増加に導く1つの要因である。

他の有利性は、AFは天然の基質であり、それゆえヒトへの用途のための潜在力を有する。例えば、AFをAFデヒドラーゼによって抗生物質マイクロテシンに変換し得る。抗生物質は食物生物保存(bio-preservation)におけるそれらの使用が知られており、これは食物工学では重要な領域である。しかし今日まで、AFならびにマイクロテシンの調製には数多くの不利性がある。例えば、ほんの少量しか生成され得なかった。また、このプロセスには経費がかかった。

本発明は、AF、およびマイクロテシンなどの他の生成物の、より多くの生産、およびずっとより安価な生産を提供することにより、これらの問題を克服する。この点では、グラムからキログラム量のAFを調製可能である。

さらなる有利性は、リアーゼは4℃で少なくとも1年間は安定であり、また活性を損なうことなく凍結乾燥し得る。

別の有利性は、リアーゼがデンプンから直接AFを生成し、そしていかなる補助酵素の存在も必要としないということである。

別の有利性は、酵素を純水中で使用し得るということである。この結果は大変驚くべきことである。

本発明のリアーゼの単純な特性に基づいて、AFの生産経費がグルコースの生産経費に匹敵することが期待され得る。本発明のリアーゼが、一般に非常に高価である補助酵素の存在を、なんら必ずしも要求しないということが、特に有利である。

一般に、 $\alpha$ -1,4-グルカンがこの酵素の基質として利用し得る。

好ましい基質として、デンプンが使用される。

好ましいプロセスでは、可溶性またはゼラチン化したデンプンまたはデンプン加水分解物を使用する。デンプン加水分解物は化学的にも酵素的にも調製し得る。

酵素を部分的にデンプンを分解するために使用する場合は、この酵素をリアーゼまたは同時に添加され得る他の追加のデンプン分解試薬（例えば、酵素のグルカノヒドロラーゼ）を添加する前に添加し得る。

リアーゼはグルカンAFに変換する。この酵素は非還元末端から基質に結合し、還元糖だけを変換しないでおく。残ったグルコースは公知の方法により除去し得、その方法のいくつかは本明細書に記載されている。

ここで記載した反応を使用して、純粋なAFを生成し得、また大量に生成し得る。

一つの実施態様では、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを菌類感染藻類（例えば *Gracilaria lemaneiformis*）から $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseでのアフィニティークロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5でのイオン交換クロマトグラフィー、および Superose 12カラムでのゲル濾過によって精製する。精製した酵素は $\alpha$ -1,4-グルカンから1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

菌類感染 *Gracilaria lemaneiformis* から単離した菌類のリアーゼは、アミロペクチンを使用した場合、3.5~7.5の至適pH、50℃の至適温度、および3.9のp

Iを有することで特徴付けられる。

別の実施態様では、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを菌類 *Morchella costata* から  $\beta$ -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティークロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィー、および Superose 12 カラムでのゲル濾過によって精製する。精製した酵素は、 $\alpha$ -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒド

ロフルクトースを生成する。

この菌類のリアーゼは、3 ~ 9 の pH 勾配を有するゲルでの等電点電気泳動で測定したところ、5.4 付近の pI を示す。8 ~ 25% の勾配を有するゲルでの SDS-PAGE により測定したところ、分子量は 110 kDa であった。この酵素は pH 5 ~ 7 の範囲で至適な pH を示した。至適温度は 30 ~ 45℃ の間であることが見出された。

別の実施態様では、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは菌類 *Morchella vulgaris* から  $\beta$ -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティークロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィー、および Superose 12 カラムでのゲル濾過によって精製する。精製された酵素は、 $\alpha$ -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

別の実施態様では、 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは藻類（例えば *Gracilariopsis lemaneiformis*）から  $\beta$ -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティークロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィーおよび Superose 12 カラムでのゲル濾過によって精製する。精製された酵素は  $\alpha$ -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

本発明によるいくつかの GL 酵素についての、リアーゼ触媒反応の代表的な至適 pH および温度は以下の通りである：

GL供給源	至適pH	至適pH範囲	至適温度
<i>M. costata</i>	6.5	5.5-7.5	37°C; 40°C <sup>a</sup>
<i>M. vulgaris</i>	6.4	5.9-7.6	43°C; 48°C <sup>a</sup>
菌類感染			
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	3.8	3.7-4.1	40°C; 45°C <sup>a</sup>

<sup>a</sup> グリコーゲンを基質として用いて測定したパラメーター；他のパラメーターはアミロペクチンを基質として用いて測定した。

本発明の酵素はアミロースおよびアミロペクチンを1,5-アンヒドロフルクトースに変換する。

試験したマルトサッカリドの中で、本発明者らはこのリアーゼがマルトースに対して低い活性を示し、マルトトリオースおよびマルトヘプタオースに対してより低い活性を示し、マルトテトラオースおよびマルトペンタオースに最高の活性を示すことを見出した。この酵素は、これらのマルトサッカリドについては10 mg/mlの濃度までは基質阻害を示さなかった。

それぞれの好ましい供給源由来の酵素は、配列決定し、アミノ酸の配列を後に示した。この酵素をコードするDNA配列も後に示した。

それゆえ本発明は、新規なデンプン分解酵素（すなわち新規な $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ）について記載する。これは初めて精製され、特徴付けられた酵素である。

上述したように、本発明はAFのいくつかの特定の使用にも関する。

特に、本発明は1,5-D-アンヒドロフルクトース（「AF」）を、抗酸化剤として、特に食料品および飲料の抗酸化剤として使用することにも関する。

それゆえ、本発明では、1,5-D-アンヒドロフルクトース（「AF」）の抗酸化剤としての使用が提供される。

好ましくは、AFは食用物質であるか、または食用物質中で使用される。

好ましくは、AFは食料品または飲料中で、あるいは食料品または飲料として使用される。

好ましくは、AFは他の抗酸化剤と組み合わせて使用する。

好ましくは、AFは本発明の方法に従って調製される。

抗酸化剤としてAFを使用することの主な有利性は、これが天然の産物であること、代謝されないこと、製造が容易であること、可溶性であること、そして一般に無毒であることである。

好ましい実施態様では、それゆえ本発明は、食物および非食物目的のために魅力的な水溶性の抗酸化剤として使用し得る、純粋なAFを酵素的に調製することに関する。適用例において、食物調製における抗酸化剤としてのAFの使用を示す。

付随の実施例において、AFが既知の高品質な市販の食物抗酸化剤に匹敵することが理解される。

非食物の例は、重合化学でのポリマー合成時の酸素除去剤としての使用を包含する。また、AFは生分解性プラスチックの合成に使用し得る。

実験は、AFが有効な還元剤（抗酸化剤）であり得ることを示した。なぜならAFは3,5-ジニトロサリチル酸を3-アミノ-5-ニトロサリチル酸に容易に還元し得るからである。

AFは天然の基質であり、それゆえ受容可能な抗酸化剤として使用される莫大な潜在性を有する。AFは、AFデヒドラーゼによって抗生物質ミクロテシンに変換され得る。抗生物質は、食物生物工学の重要な分野である食物生物保存におけるその使用が知られている。

別の局面では、本発明はまた、1,5-D-アンヒドロフルクトースの甘味料としての、特に食料品および飲料、好ましくはヒトの食料品および飲料の甘味料としての使用に関する。

それゆえ、本発明のこの局面では、1,5-D-アンヒドロフルクトースの甘味料としての使用が提供される。

好ましくは、AFはヒトの食料品および飲料として、あるいはヒトの食料品および飲料中で使用される。

AFは、5%溶液または100mg/kgから500mg/kgなどの所望の量で使用され得る。

AFを甘味料として用いる有利性は、これが天然の産物であるということ、一般に無毒であること、水溶性であること、代謝されないこと、および生成が容易であることである。

それゆえ本発明はまた、甘味料としてのAFの新規な適用に関する。

好ましくは、AFは本発明の方法によって調製される。

本発明のさらなる局面は以下を包含する：

菌類感染藻類、菌類、または藻類単独から酵素を単離することを含有する酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ(GL)の調製方法；

配列番号1、または配列番号2、または配列番号5、または配列番号6のアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の変異体を含む酵素。

配列番号9、または配列番号10、または配列番号11のアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の変異体を含む酵素；

酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードするヌクレオチド配列、好ましくは、ここでその配列が自然環境に存在しない（すなわち、この酵素を発現し得る細胞生物のゲノムの一部を形成しない）、好ましくは、ここでヌクレオチド配列はDNA配列である；

DNA配列が配列番号3、または配列番号4、または配列番号7、または配列番号8のいずれかに同一である、または相補的である、または実質的同一性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を少なくとも含むヌクレオチド配列、好ましくはここでこの配列が単離された形態である；

DNA配列が配列番号12、または配列番号13、または配列番号14のいずれかに同一である、または相補的である、または実質的同一性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を少なくとも含むヌクレオチド配列、好ましくはここでこの配列が単離された形態である；および、

酵素（好ましくはGL）を精製するための $\beta$ -シクロデキストリンの使用。

本発明の他の好ましい実施態様は、以下のいずれかを含む：本明細書に記載のDNA配列を導入する結果としてAFを生産する能力を有する形質転換された宿主生

物；微生物である形質転換された宿主生物、好ましくは宿主生物は、細菌、糸状菌、菌類および酵母からなる群から選択され；好ましくは宿主生物は、*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Pichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia* (例えば、*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Escherichia coli*) からなる群から選択され；糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法、この方法は酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードするヌクレオチド配列を発現する形質転換された宿主生物の使用を含み、好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列であり、好ましくはDNA配列は本明細書に記載の配列の1つである；本明細書に記載のヌクレオチド配列を取り込んだベクター、好ましくはベクターは複製ベクターであり、好ましくはベクターはプロモーター配列から下流のヌクレオチド配列を含有している発現ベクターであり、好ましくはこのベクターは(耐性マーカ-

などの) マーカーを含有している；そのようなベクターで形質転換された細胞生物または細胞株；産物 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼあるいは同酵素をコードする任意のヌクレオチド配列または一部分を生産する方法であり、この方法はそのようなベクターで形質転換されたそのような生物(または細胞株由来の細胞)を培養する工程、および産物を回収する工程を含有する。

特にこの発現系では、酵素は、好ましくは精製を容易にするように分泌されるべきである。そのために成熟酵素をコードするDNAを、選択した宿主由来のシグナル配列、プロモーターおよびターミネーターに融合させる。

*Aspergillus niger*における発現のため、*gpdA*(*Aspergillus nidulans*のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子由来)プロモーターおよびシグナル配列を成熟リアーゼをコードするDNA(例えば配列番号3または配列番号4)の5'末端に融合する。*A. niger*の*trpC*遺伝子のターミネーター配列をその遺伝子の3'末端におく(Punt, P.J.ら、(1991):*J. Biotech.* 17,19-34)。この構築物を*E. coli*のための複製オリジンおよび選択オリジンならびに*A. niger*のための選択マーカーを含むベクターに挿入する。*A. niger*のための選択マーカーの例としては、*amdS*遺伝子、*argB*遺伝子、*pyrG*遺伝子、*hygB*遺伝子、*BmlR*遺伝子などがある。

り、すべて形質転換体の選択に用いられてきた。このプラスミドを *A. niger* に形質転換し得、そして成熟リアーゼを形質転換体の培養液中から回収し得る。最後に、この構築物を、培養液中でのリアーゼのタンパク質分解を減少されるためにプロテアーゼ欠損株に形質転換し得る (Archer D.B.ら、(1992): *Biotechnol. Lett.* 14, 357-362)。

宿主として *Aspergillus niger* のかわりに、それらについて良好な発現系が公知である、以下のような他の工業的に重要な微生物を使用し得る ; *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp., *Bacillus subtilis*, *B. amylolique faciens*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., または *E. coli*。

以下の試料をブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)、23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, AB2 1RY に 1994 年 6 月 20 日に

寄託した :

プラスミド pGL1 保有 *E. coli* (NCIMB 40652) - [参考 DH5 $\alpha$  - pGL1] ; および

プラスミド pGL2 保有 *E. coli* (NCIMB 40653) - [参考 DH5 $\alpha$  - pGL2]。

以下の試料はブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)、Dunstaffnage Marine Laboratory PO Box 3, Oban, Argyll, Scotland, United Kingdom, PA34 4AD に 1994 年 10 月 11 日に寄託の承認がされた。

菌類感染 *Gracilariopsis lemaneiformis* (CCAP 1373/1) - [参考 GLQ-1 (Qingdao)]。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物 NCIMB 40652 または寄託物 NCIMB 40653 の対象であるプラスミドに存在する GL コード配列の発現により取得し得る GL 酵素 ; および寄託物 CCAP 1371/1 の対象である菌類感染藻類から取得し得る GL 酵素を包含する。

以下の試料をブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)、23 St. Ma

char Drive, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, AB2 1RYに1994年10月3日に寄託した：

プラスミドpMC保有*E. coli*(NCIMB 40687)-[参考DH5 $\alpha$ -pMC]；

プラスミドpMV1保有*E. coli*(NCIMB 40688)-[参考DH5 $\alpha$ -pMV1]；および

プラスミドpMV2保有*E. coli*(NCIMB 40689)-[参考DH5 $\alpha$ -pMV2]。

プラスミドpMCは、*Morchella costata*から作製されたゲノムライブラリーから単離された4.1 kbのフラグメントを含有するpBluescript II KSである。このフラグメントは $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

プラスミドpMV1は、*Morchella vulgaris*から作製されたゲノムライブラリーから単離された2.45 kbのフラグメントを含有するpBluescript II KSである。このフラグメントは $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子の5'末端を含有する。

プラスミドMV2は、*Morchella vulgaris*から作製されたゲノムライブラリーから単離された3.1 kbのフラグメントを含有するpUC19である。このフラグメントは $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子の3'末端を含有する。

以下の考察において、MCは*Morchella costata*を表し、MVは*Morchella vulgaris*を表す。

言及したように、*Morchella vulgaris*由来のGLコード配列は、2つのプラスミドに含有された。図15を参考にすると、pMV1は454位から2902位までのヌクレオチドを含有する；そして、pMV2は2897位から（これを含む）下流のヌクレオチドを含有する。図12および13を参考にすると、コード配列を結合するために、pMV2を制限酵素EcoRIおよびBamHIで消化し、次に目的のフラグメントを制限酵素EcoRIおよびBamHIで消化したpMV1に挿入し得る。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物NCIMB 40687または寄託物NCIMB 40688および寄託物NCIMB 40689の対象であるプラスミドに存在するGLコード配列の発現により取得し得るGL酵素を包含する。

以下の試料はまたブダベスト条約に従い承認された寄託機関であるThe Culture Collection of Algae and Protozoa(CCAP)、Dunstaffnage Marine Laboratory

P0 Box 3, Oban, Argyll, Scotland, United Kingdom, PA34 4ADに1994年10月1日に寄託の承認がされた。

菌類感染 *Gracilariopsis lemaneiformis* (CCAP 1373/2) - [GLSC-1(California)]。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物CCAP 1373/2の対象である藻類から取得し得るGL酵素を包含する。

本発明はここで実施例によってのみ記載される。

以下の実施例において、添付する以下の図に言及する：

図1は、染色した菌類感染藻類を示す；

図2は、染色した菌類感染藻類を示す；

図3は、菌類菌系の切片を示す；

図4は、菌類感染藻類の切片を示す；

図5は、菌類感染藻類の切片を示す；

図6は、pGL1のプラスミド地図を示す；

図7は、pGL2のプラスミド地図を示す；

図8は、配列番号3として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図9は、配列番号1と配列番号2とのアライメント (alignment) を示す；

図10は、顕微鏡写真である。

図11は、pMCのプラスミド地図を示す；

図12は、pMV1のプラスミド地図を示す；

図13は、pMV2のプラスミド地図を示す；

図14は、*Morchella costata*から得られたゲノムDNAのGLコード配列ならびに5'および3'の非翻訳領域を示す；

図15は、*Morchella vulgaris*から得られたゲノムDNAのGLコード配列ならびに5'および3'非翻訳領域を示す；

図16は、*Morchella costata*および*Morchella vulgaris*由来のGLコード配列ならびに非翻訳領域の比較を示す；

図 17 は、配列番号 5 として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図 18 は、配列番号 6 として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図 19 は、AF の存在または非存在での酸素消費のグラフを示す；そして、

図 20 は TLC プレートを示す。

より詳細には、図 1 は、*Gracilariopsis lemaneiformis* の上部および下部での菌類を表す Calcoflour White 染色を示す (108× および 294×)。

図 2 は、菌類を有する *Gracilariopsis lemaneiformis* の PAS/Anilinblue Black 染色を示す。菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

図 3 は、藻類細胞の厚い壁 (w) 間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸 (f) の縦方向で表面付近の切片を示す顕微鏡写真である。藻類のクロロプラスト中のチラコイド膜に留意 (矢印)。

図 4 は、クローン 2 プローブを用いたアンチセンス検出 (上列) が、次の切片の Calcoflour White 染色 (下列) により示される菌類に、限定されるようであることを示す (46× および 108×)；

図 5 は、クローン 2 プローブを用いた強いアンチセンス検出が *Gracilariopsis lemaneiformis* 内の菌類上に見出されたことを示す (294×)。

図 6 は、プラスミド pGL1 の地図を示す。これは菌類に感染した *Gracilariopsis lemaneiformis* から作製したゲノムライブラリーから単離した 3.8kb のフラグメントを含有する pBluescript II KS である。このフラグメントは  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

図 7 は、プラスミド pGL2 の地図を示す。これは菌類に感染した *Gracilariopsis lemaneiformis* から作製したゲノムライブラリーから単離した 3.6kb のフラグメントを含有する pBluescript II SK である。このフラグメントは  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

図 9 は、配列番号 1 (GL1) と配列番号 2 (GL2) とのアライメントを示す。GL1 の総残基数は 1088 であり；GL2 の総残基数は 1091 である。比較をするにあたって

構造-遺伝子的マトリックス (structure-genetic matrix) を用いた (Open gap cost:10; Unit gap cost:2) 図9中で、並べた二つの残基が同一であることを示す記号は「:」であり; 並べた二つの残基が類似であることを示す記号は「.」である。「類似である」といわれるアミノ酸はA, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, Wである。全体で、同一が845アミノ酸 (すなわち77.67%) 存在し; 類似が60アミノ酸 (5.51%) 存在する。GL1に挿入したギャップの数は3であり、GL2に挿入したギャップの数は2である。

図10は、藻類の壁 (W) 間で成長した菌糸 (f) の顕微鏡写真である。藻類細胞中の紅藻デンプン (s) およびチラコイド (矢印) の粒子に留意のこと。

図14において、総塩基数は4726であり、DNA配列組成は: 1336A; 1070C; 1051G; 1269Tである。ATG開始コドンを太字で示す。イントロンには下線を付す。終止コドンを斜体で示す。

図15において、総塩基数は4670であり、DNA配列組成物は: 1253A; 1072C; 1080G; 1265Tである。ATG開始コドンを太字で示す。イントロンには下線を付す。終止コドンを斜体で示す。

図16において、二つの並べられた配列は、MC (総残基数1066) およびMV (総残基数1070) から得られた配列である。使用した比較マトリックス (comparison matrix)

x) は、構造-遺伝的マトリックス (structure-genetic matrix) である (Open gap cost:10; Unit gap cost:2)。図中、二つの並んだ残基が同一であることを示す記号は「:」である。二つの並んだ残基が類似であることを示す記号は「.」である。「類似」であるといわれるアミノ酸は: A, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, Wである。全体では、: 同一: 920 (86.30%); 類似: 51 (4.78%) である。MCに挿入されたギャップの数は1であり、MVに挿入されたギャップの数は1である。

付属の配列リストにおいて: 配列番号5は、*Morchella costata* から得られたGLのアミノ酸配列である; 配列番号6は、*Morchella vulgaris* から得られたGLのアミノ酸配列である; 配列番号7は、*Morchella costata* から得られたGLのヌクレオチド配列である; 配列番号8は、*Morchella vulgaris* から得られたGLのヌクレオチド配列である。

配列番号5においては総残基数は1066である。GL酵素は以下のアミノ酸組成を有する：

46 Ala	13 Cys	25 His	18 Met	73 Thr
50 Arg	37 Gln	54 Ile	43 Phe	23 Trp
56 Asn	55 Glu	70 Leu	56 Pro	71 Tyr
75 Asp	89 Gly	71 Lys	63 Ser	78 Val

配列番号6においては総残基数は1070である。GL酵素は以下のアミノ酸組成を有する：

51 Ala	13 Cys	22 His	17 Met	71 Thr
50 Arg	40 Gln	57 Ile	45 Phe	24 Trp
62 Asn	58 Glu	74 Leu	62 Pro	69 Tyr
74 Asp	87 Gly	61 Lys	55 Ser	78 Val

## 実験

### 1 可溶性酵素系：

#### 1.1. 菌類感染 *Gracilariopsis lemaneiformis* から単離したリアーゼの安定性および活性に及ぼす pH の影響

二つの緩衝系、すなわち H<sub>2</sub>OAc および NaOAc、ならびにクエン酸ナトリウム（クエン酸を 5mM の濃度で）、37℃ で試験した。試験した pH の範囲は、pH 3 から pH 5.2 であった。このリアーゼは、3.6 と 4.2 との間の pH 範囲で最大の活性を示した。pH

3 では、この酵素の安定性および活性は約 90% 減少した。pH 5.2 では活性は約 64% 減少した。しかしこの酵素は、この pH では pH 3 に比較してかなり安定であり、pH 5.2 で得られた AF の収量は pH 3.8 で得られた AF の収量の 75% であった。H<sub>2</sub>OAc および NaOAc 緩衝液においての方がクエン酸緩衝液よりもいくぶん AF の収量が高かった。これは、AF のアッセイ法における二つの緩衝液（AF アッセイ混合液中、最終濃度は 125 μM）のいかなる異なった影響によるものではない。

#### 1.2. リアーゼの活性および安定性に及ぼす温度の影響。

この実験は最適 pH 範囲で行った。25℃ では AF の生産は少なくとも 9 日間まで直線的であった。このことは、9 日以内ではリアーゼの活性および安定性の損失が

なかったことを示す。温度が上昇するにつれて、酵素の安定性は減少した。

この酵素の活性の、以下の温度での半減期は以下の通りであった。

30℃ 5日

37℃ 2.5日

40℃ 1日以下

50℃ 1日以下

### 1.3. このリアーゼの安定性およびAFの収量に及ぼす基質濃度の影響

アミロペクチンおよびデキストリンはリアーゼに対して安定化する効果を有することが観察されたが、最も小さな基質であるマルトースではこのような効果を有さなかった。このことは可溶性酵素系および固定化酵素系の両方について証明された。

AFの収量は、アミロペクチンの濃度が25%まで増加するにつれて増加した。デキストリンの場合は、濃度が30%を越えると、AFの収量は減少した(30%, 40%および50%を試験した)。

### 1.4. リアーゼの活性化および不活性化

活性化のために金属イオンは必要でないことが見出され、この酵素に触媒される反応は驚くほど純水中で進行し得た。反応混合液にEDTAを20mMまで添加して

も活性にはほとんど影響がないという事実は、明らかに本発明によるこのリアーゼ酵素の活性には、金属イオンが必要でないことを示す。

このことは、AFの精製工程で、水を反応媒体とする場合は、反応系から塩を除去するイオン交換クロマトグラフィーの工程を省き得ることを意味する。しかし、反応混合液にNaClを0.85%(0.145 M)の濃度で含有すると、AFの収量を1倍まで増加し得る。

### 1.5. 基質特異性

可溶化デンプンは、デンプンの濃度が高くなる場合、冷却するにつれて固いゲルを形成する傾向がある。それゆえ、この $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの基質として部分分解したデンプンを利用することは有利である。

M. costataから単離した1,4-グルカンリアーゼの、異なるオリゴサッカリドに

対する特異性を試験した。オリゴサッカリドは、マルトース(G2)、マルトトリオース(G3)、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)、マルトヘキサオース(G6)、およびマルトヘプタオース(G7)であった。これらのオリゴサッカリドは水に8 mg/mlの濃度で溶解した。この酵素アッセイは、150  $\mu$ lのG2/G3/G4/G5/G6/G7の基質、120  $\mu$ lの0.1 M MES pH6.3および30  $\mu$ lの精製した酵素を含有した。反応混合液は30℃で60分間インキュベートした。後に、反応を3分間煮沸して停止させ、900  $\mu$ lの無水エタノールを加えて沈殿させた。4℃で20,000 $\times$ gで5分間遠心分離した後、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、凍結乾燥した。

凍結乾燥させた試料を1000  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oに溶解し、25  $\mu$ lの試料をDionex HPLCにロードする前に0.22  $\mu$ m Milliporeフィルターで濾過した。

#### 1.7. HPLC

##### 分析手順

分析は、GPM-2ポンプおよびPED検出器（パルス電流検出モード(pulse-amperometric detection mode)で使用した）からなるDionex 4500iクロマトグラフィシステムで行った。

陰イオン交換カラムはDionexのCarboPac PA-100(4 $\times$ 250mm)およびCarboPac PA-100ガードカラム(3 $\times$ 25mm)であった。

溶離剤は200mM水酸化ナトリウム(A)、500mM酢酸ナトリウム(B)および18 Mオームの脱イオン水(C)であった。ポンプは方法番号1および方法番号2である2つの異なった方式でプログラムした。

方法番号 1:

時間、分	0.0	3.0	3.1	26.9	29.0
% A	10	10	50	50	10
% B	0	0	0	32	0
% C	90	90	50	18	90

方法番号 2:

時間、分	0.0	30
% A	10	10
% B	0	0
% C	90	90

#### 標準品：

グルコース、マルトース、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、およびマルトヘプタオース（すべてSigma）、ならびに1,5-アンヒドロフルクトースを標準品として用いた。すべての化合物を18 Mオームの脱イオン水に溶解し、使用前に0.22  $\mu$ m Milliporeフィルターで濾過した。

#### 1.7. 結果：

分析により、*M. costata*から単離した精製酵素は、実際に1,5-アンヒドロフルクトース形成のためにマルトオリゴサッカリドを基質1として利用し得るということが示される。

マルトースを基質として使用した場合、1,5-アンヒドロフルクトースはほとんど全く形成されなかったが、他のマルトオリゴサッカリド(G3-G7)を使用した場合、多量のこの化合物が生成された。

より長いマルトオリゴサッカリドを使用した場合、より多量の1,5-アンヒドロフルクトースが得られたということが明らかである。

この観察は、リアーゼが基質の非還元末端側から1,5-アンヒドロフルクトースを生成し、末端のグルコース分子のみを変化させないという理論と、良好に完全に対応している。

#### 1.8. AFの形成

*M. costata*由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは、デンプンを最終生成物の1,5-アンヒドロフルクトースに加水分解する。最終生成物は方法2のHPLCで示された。酵素アッセイは500  $\mu$ lのアミロペクチン(20mg/ml、水に溶解)、400  $\mu$ lの0.1 M M

ES pH6.3および100 $\mu$ lの精製した酵素を含有した。反応混合液を30℃でインキュベートし、インキュベーションの30分または120分後に煮沸して反応を停止させた。高分子量のオリゴサッカリドを3倍量の無水エタノールを加えて沈殿させ、試料を前述のように遠心分離して凍結乾燥した。試料を125 $\mu$ l H<sub>2</sub>Oに溶解し、そのうち25 $\mu$ lをHPLCカラムにのせた。

HPLCの溶出プロフィールは、*M. costata*由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼが、デンプンの加水分解により1,5-アンヒドロフルクトースを生成することを明らかに示す。インキュベーション30分後および120分後に等しい量の1,5-アンヒドロフルクトースが見出され、このことはこの酵素の活性が、最終生成物である1,5-アンヒドロフルクトースにより阻害されないことを示す。

この方法で調製されたAFの<sup>13</sup>C NMRスペクトル(水)は、以下の信号を生じさせる1つの主要な形態をとることを示す： $\delta$  93.5(カルテット( quart ), C-2), 81.5(CH, C-5), 77.7(CH, C-3), 72.6(CH<sub>2</sub>, C-1), 69.8(CH, C-4), 62.0(CH<sub>2</sub>, C-6)。帰属はH-H、C-HおよびC-H 2D相関スペクトルに基づいた。

#### 1.6. リアーゼのブルラナーゼおよびイソアミラーゼとの協同作用の影響

表1に見られるように、反応混合液にブルラナーゼを含有すると、基質として可溶性デンプンを使用するかアミロペクチンを使用するかに依存して、AFの収量が約15~23%明らかに増加した。

表 AFの生産におけるプルラナーゼとリアーゼの協同作用。

基質	リアーゼ	プルラナーゼ	AF 収量 (%)	Glc 収量 (%)
可溶性 デンプン	+	-	51	0
	-	+	0	0.37
	+	+	66.0	3.9
アミロペクチン	+	-	48.0	0
	-	+	0	0.33
	+	+	71.3	3.7

+, 酵素添加, - 酵素省略

反応混合液は、示したように0.3mlの水中の2%バレイショアミロペクチン(Sigma)または0.3mlの2%可溶性デンプン(Merck)、2  $\mu$ lのリアーゼならびに0.36単位プルラナーゼ(BM)を含有していた。

反応は30℃で1日行った。反応終了時に、試料をAFおよびGlcの分析に用いた。

イソアミラーゼの場合は、このリアーゼの至適pHがPseudomonasのイソアミラーゼの至適pH(pH3.0~4.5)と重なるので有利である。しかし、問題はイソアミラーゼが過剰量の長鎖アミロースを生成することである。過剰量の長鎖アミロースは溶液中で沈殿し、それゆえもはやリアーゼの基質としては適切ではない。リアーゼのイソアミラーゼとの協同作用は、アミロースの鎖が長すぎない場合、効率

的であると期待され得る。

## 2. 固定化酵素系

スクシンイミド活性化Sepharose(Affigel 15ゲル, Bio-Rad)およびグルタルアルデヒド活性化シリカゲル(BM)を使用して、リアーゼの固定化を達成した。Affi

gel 15ゲルに固定化した後のリアーゼ活性の回収は40%~50%の間であった。固定化後にまだ活性であるが、立体障害のため（特にデンプンのような巨大分子の場合に）、基質に接近し得ないリアーゼもいくらか存在し得る。工業で使用する固定化酵素は、通常50%付近の活性回収を有する。

Affigel 15ゲル固定化リアーゼについての最も興味深いことは、pH5.5で安定性が大きく向上することである。カラムをこのpHで操作する場合、安定性は少なくとも16日間の長さであった。プルラナーゼの至適pHがpH5.5付近であることを考慮すると、安定性におけるpHの変動は大変重要である。このことは、リアーゼおよびプルラナーゼが同じ物理化学的環境で同じ反応器で、効率的に協同作用するための必要条件である。可溶性のリアーゼは、3.6と4.2との間の至適pHを有し、このpH範囲ではプルラナーゼはほとんどあるいは全く活性を示さない。

シリカゲル固定化リアーゼでは、活性回収は非常に高く、80~100%付近であった。しかし、シリカゲル固定化酵素は、カラムをpH3.8あるいはpH5.5のいずれで操作しても安定でなかった。いくらかのリアーゼがシリカゲルビーズの表面に吸着していて、カラムを洗浄するたびにシリカゲルから徐々に放出された可能性がある。それゆえ、高い回収率とカラム活性の減少に寄与しているのは吸着したリアーゼであり得る。

### 3. AFの精製

#### 3.1. リアーゼ-アミロペクチン/可溶性デンプン系

この系では、反応系は反応終了時に、AF、限界デキストリン、リアーゼ、および緩衝塩を含有した。AFは巨大分子（限界デキストリンおよびリアーゼ）からエタノール沈殿（最終濃度50%）により分離した。沈殿されない低分子量のアミロペクチンは、Amicon YM3膜（カットオフ3,000）をウルトラフィльтраクションし

て分離した。エタノールは、ロータリーエバポレーター内で40℃で蒸発させた。緩衝塩を、混合イオン交換剤によりAFから除去した。精製した固体のAFは、凍結乾燥によって得られた。

#### 3.2. リアーゼ-プルラナーゼ/アミロペクチン/可溶性デンプン系。

この系では、最終産物は、AFおよびグルコースである。少なくとも実質的に純

粹なAFの試料を調製する場合は、副生成物であるグルコースを除去しなければならない。これは酵素法で達成し得る。最初にグルコースは、グルコースオキシダーゼによってグルコン酸および過酸化水素に変換される。

形成された $H_2O_2$ を除去するためにカタラーゼが必要である。 $H_2O_2$ はAFを酸化して現時点では構造が未知の2つの化合物にする。AF調製の際の他の夾雑物は、AFの酸化生成物である。AFは空気中の程度の酸素によって、特に高温、高濃度のAF、および長時間の曝露において、徐々に酸化され得ることが観察された。

グルコン酸はイオン交換クロマトグラフィーによって緩衝塩とともに除去された。

この系では、低分子量のアミロペクチン分子は、あるいはウルトラフィルトレーションを使用する代わりに、アミログルコシダーゼによって加水分解され得る。

### 3.3. AFの純度の確認

AF調製物の純度を、TLC、Dionex、およびNMRによって確認した。

### 3.4. アンヒドロフルクトースの酸化防止活性の分析

電気化学的酸素消費：

#### 方法

AFの活性を、メチルリノレートエマルジョンにおいて、JorgensenおよびSkibsted (Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1993) 196:423-429) 記載を以下のように若干変更して検討した：pH=5.8の5.0mMリン酸緩衝水溶液中の液および乳化剤としての0.2 w/w % Tween 20中の、1.33 mMメチルリノレートエマルジョン5.00 mlに、AFを以下の濃度で加えた：0、15、146、および680  $\mu$ M。この系の酸化は、

最終濃度0.26 mMの50  $\mu$ l 0.26 Mメトミオグロビン(MMb)を添加することにより開始した。反応開始直後、試料を恒温化した( $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) 70  $\mu$ lの閉鎖セルに注入し、系に酸素が拡散することを効果的に防いだ。酸素消費は、PCデータ収集プログラムに連結したClark電極で測定した。相対的な酸素濃度(%)を、30秒ごとに記録した。

#### 結果

異なった試料についての酸素消費量に対応する曲線を、図19に例示する。AFを添加しなかった試料については、酸素消費量における相対的減少が、試料を注入した直後に見られる。AFを含有する試料については、曲線が急に出現して酸素濃度が減少する前に、遅延相(lag-phase)が観察される。遅延相の後、AFを添加しない試料に比較してわずかな酸素消費速度の減少が観察される。最も多量のAFを含む試料が、最も長い遅延相を有するという傾向が観察される。なお、酸素消費速度はこれらの試料ではより低いので、これは対照(0  $\mu$ M)の傾斜角と比較して、より小さな傾斜角の曲線により見られる。

#### ESR分析

##### 方法

ヒドロキシラジカルを、 $H_2O_2$  (0.17 mM)および $FeSO_4$  (4.8  $\mu$ M)を用いてフェント  
ン反応によって生成した。生成したラジカルを5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキ  
シド(DMP0, 9.7mM)によって捕集した。AFを1.3mMおよび6.3mMの濃度で添加した。  
ローズマリー(*Rosmarinus officinalis* L.)の水溶性抽出物を0.25mg/mlの濃度(グ  
ラムで、1.26mMのAFに相当する)で分析した。測定は、以下のような分光光度  
計の設定で、120秒に室温(20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)で行い、300秒後に同一の反応混合液につい  
て繰り返した：中心磁場(center field)3475.60 G;掃引幅 55 G;マイクロ波出力  
20 mW;変調周波数100 kHz;変調幅 1.01 G;受信増幅比  $1.00 \cdot 10^5$ ;変換時間81.92  
ms時間定数163.84 msおよび掃引時間83.89s。

##### 結果

生成されたヒドロキシラジカルをDMP0によって捕集した。スピニアダクト(spin  
adduct)は特徴的な1:2:2:1 ESRスペクトルを生じさせる。スペクトルのピー

ク高さは、生じたスピングダクトの量に比例する。DMP0およびAF両方の添加は、ス  
ピントラップとAFとの間での競合を生じさせる。ピーク高さの減少は、AFの良好  
な捕捉活性(scavenging activity)を示す。

表：ESRスペクトルのピーク高さ。  $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.17 \text{ mM}$  および  $\text{Fe}^{2+} = 4.8 \text{ } \mu\text{M}$ 

アルドプロフェトース [mM]	ローズマリー抽出物 [mg/ml]	ピーク高さ [120 s]	ピーク高さ [300 s]
0	0	2475	2780
1.3	0	2634	2545
6.3	0	1781	1900

1.3 mM AFの濃度では、ヒドロキシラジカルの捕捉活性は見られなかったが、6.3 mM AFでは、ピーク高さが減少し、これは生成されたヒドロキシラジカルの一部がAFにより捕捉されることを示す。

#### 4. 抗酸化剤としてのAFの使用

##### 実施例 4.1

##### 50%マヨネーズにおける抗酸化剤としてのAFの使用

50%マヨネーズは、料理店および小売商の両方で、サラダ、オープンサンドなどに使用される。50%マヨネーズは低油含有であるので、低カロリー使用に適切である。

代表的なマヨネーズの組成は以下の通り：

大豆油	50.0%
タラゴン酢	4.0%
卵黄	3.5%
砂糖	3.0%
塩	1.0%
ソルビン酸カリウム	0.1%
水	35.2%
MAYODAN 602	3.0%

レモン香料 10251 0.2%

MAYODAN 602は、良質で安定な油の分散および要求される粘性を確保し、それゆえ50%マヨネーズに長い貯蔵期間を提供する。。

香料 10251は、マヨネーズに新鮮なレモンの風味を与える天然のレモン香料である。

代表的なマヨネーズは以下の方法で調製される：

- 1) MAYODAN 602、砂糖、および塩を乾燥混合する。粉末1対油2の割合で油中に分散させる。
- 2) 香料およびソルビン酸カリウムを水に加え、Korumaミキサーに注ぐ。1)を加える。
- 3) 卵黄を加える。
- 4) 減圧下で連続的に油を加える。
- 5) 油の2/3を（ゆっくり）加えた後、タラゴン酢を残りの1/3の油と混ぜ合わせ、加える。

以下のデータは、AFを抗酸化剤として加えた場合、公知の食物抗酸化剤であるGRINDOX 142およびGRINDOX 1029に匹敵することを示す。

GRINDOX 142：

アスコルビルバルミテート	10%
プロビルガレート	20%
クエン酸	10%
食物用乳化剤	60%
25℃での形状	ペースト
色	灰色から薄茶色 (pale brown)
密度	1.1g/ml

(全百分率は重量による)

GRINDOX 1029：

アスコルビルバルミテート	20%
天然トコフェロール	20%

食物用乳化剤	60%
25℃での形状	ペースト
色	淡褐(light brown)
密度	1.0g/ml

(全百分率は重量による)

試験手順において、抗酸化剤を、抗酸化剤濃度が約500 ppmの析となるようにマヨネーズに添加した。次に、マヨネーズを純0<sub>2</sub>を含有する80℃のボンベ熱量計においた。そして、生成物が実質的に酸化し始めるまでの誘導期間を測定した。

結果は以下のとおりである。

試料:	IP(時間)
1. ブランク	28,0
2. +500ppm GRINDOX 142	35,0
3. +500ppm GRINDOX 1029	33,3
4. +550ppm GRINDOX 1029	34,3
5. +500ppm 1,5-D-アンヒドロフルクトース	32,0

(IP時間 = 誘導期間)

これらの結果は、AFが優れた食物抗酸化剤であり、そして公知の食物抗酸化剤であるGRINDOX 142およびGRINDOX 1029に匹敵するということを示す。

#### 実施例4.2

##### サラダドレッシングにおける抗酸化剤としてのAFの使用

##### 50%油を含むヨーグルトサラダドレッシング

50%油を含むヨーグルトサラダドレッシングは、サラダ、ジャガイモ、生野菜サラダ、肉、魚および温野菜に使用される。

#### 組成

大豆油	50.0%
ヨーグルト(プレーン)	39.0%
酢(10%)	3.5%
砂糖	3.0%

卵黄	2.0%
塩	1.0%
ソルビン酸カリウム	0.1%
MAYODAN 525	1.4%
酸マスキング香料2072	0.02%

MAYODAN 525は、独特の乳化安定性を与え、離液を防ぎ、均一な油分散と粘性を確保し、生産プロセスへの寛容を向上させ、長い保存期間を確保する。

香料2072は天然物と同一の、酸マスキング香料であり、pH値に影響を与えることなく、酸味を減少させる。

#### プロセス

1. MAYODAN 525、砂糖、および塩を乾燥混合する。粉末1対油2の割合で油に分散させる。
2. 香料、ソルビン酸カリウム、およびヨーグルトを水に加え、Korumaミキサーに注ぐ。1)を加える。
3. 卵黄を加える。
4. 減圧下で連続的に油を加える。
5. 油の2/3を（ゆっくり）加えた後、酢を残りの1/3の油と混ぜ合わせ、加える。
6. 必要に応じて香辛料を加える。

#### 試験結果：

試料：	IP(時間)	PF
1. ブランク	37.2	1.00
2. 500 ppm 無水フルクトース	39.5	1.06
3. 800 ppm GRINDOX 1032	43.3	1.07
(IP-誘導期間)；(PF-保護期間)		

#### 保護要素 (PF)：

温度ごとに以下のように定義される

PF = 抗酸化剤を加えた油のIP / 抗酸化剤を加えない油のIP

寿命延長 (life extension) (LE) (%) :

$$LE = (PF - 1.0) \times 100$$

6.  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの調製

緒言

本発明のさらなる実施態様に関して、AFの調製に使用する酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは、菌類感染藻類、好ましくは菌類感染 *Gracilariopsis lemaneiformis*、より好ましくは菌類感染 Qingdao (中国) 由来の *Gracilariopsis lemaneiformis* から単離し得る。

あるいは、この酵素は菌類から得取され得る。例えば、菌類は *Discina perlat* a, *Discina parma*, *Gyromitra gigas*, *Gyromitra infula*, *Mitrophora hybrida*, *Morchella conica*, *Morchella costata*, *Morchella elata*, *Morchella hortensis*, *Morchella rotunda*, *Morchella vulgaris*, *Peziza badia*, *Sarcosphaera eximia*, *Disciotis venosa*, *Gyromitra esculenta*, *Helvella crispa*, *Helvella lacunosa*, *Leptopodia elastica*, *Verpa digitaliformis*, および *Morchella* の他種のいずれかであり得る。好ましくは菌類は *Morchella costata* または *Morchella vulgaris* である。

本発明のさらなる実施態様に関して、AFの調製に使用する酵素 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼは、藻類単独、好ましくは *Gracilariopsis lemaneiformis*、より好ましくは Santa Cruz (カリフォルニア) 由来の *Gracilariopsis lemaneiformis* から単離し得る。

最初の酵素精製は、Yuら (前出) に記載の方法により実施し得る。しかし、好ましくは、最初の酵素精製は、精製工程下で分解しない固体支持体を使用する、至適化された手順を含む。このゲル支持体は、標準的な実験室タンパク質精製設備に適合するという有利性を有する。この至適化した精製ストラテジーの詳細を、後に示す。精製はタンパク質精製のための公知の標準的な技術により終結される。

酵素の純度は、補足の電気泳動技術を使用して容易に確認し得る。

A. 供給源 = 菌類感染藻類

以下の配列情報を、下記のPCR反応のためのプライマーを作成するため、およびそれぞれのヌクレオチド配列から生成するアミノ酸配列を確認するために使用した。

菌類感染 Gracilariaopsis lemaneiformis 由来のペプチドから組み合わせたアミノ酸配列

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala  
Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn  
Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly  
Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu  
Asn Ser Thr Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp  
Tyr Lys Phe Gly Pro Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala

プライマー A および B を作成するために使用したアミノ酸配列 (27-34) (Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val)

プライマー A

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) TC(GATC) AA(CT) GT 128 種混合

プライマー B

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) AG(CT) AA(CT) GT 64 種混合

プライマー C を作成するために使用したアミノ酸配列 (45-50) (Gly Gly His Asp Gly Tyr)

プライマー C

TA (GATC)CC (GA)TC (GA)TG (GATC)CC (GATC)CC 256 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

プライマー E を作成するために使用したアミノ酸配列 (74-79) (Gln Trp Tyr Lys Phe Gly)

プライマー E

GG(GATC) CC(GA) AA(CT) TT(GA) TAC CA(CT) TG 64 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

プライマーF1およびF2を作成するために使用したアミノ酸配列(1-6)(Tyr Arg Trp Gln Glu Val)

プライマーF1

TA(TC) CG(GATC) TGG CA(GA) GA(GA) GT 32 種混合

プライマーF2

TA(TC) AG(GA) TGG CA(GA) GA(GA) GT 16 種混合

第1回目のPCR増幅から得られた配列(クローン1)

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT  
TCTTGGCGGC CACGACGGTT A

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly  
Gly His Asp Gly

第2回目のPCR増幅から得られた配列(クローン1)

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT  
TCTTGGTGGG CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG  
AGAATTCGAC CGAACGNGAA TTGTACTTGC CCGTGCTGAC CCAATGGTAC  
AAATTCGGCC C

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly  
Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu  
Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro

第3回目のPCR増幅から得られた配列(クローン2)

TACAGGTGGC AGGAGGTGTT GTACACTGCT ATGTACCAGA  
 ATGCGGCTTT CGGGAAACCG ATTATCAAGG CAGCTTCCAT  
 GTACGACAAC GACAGAAACG TTCGCGGCGC ACAGGATGAC  
 CACTTCCTTC TCGGCGGACA CGATGGATAT CGTATTTTGT  
 GTGCACCTGT TGTGTGGGAG AATACAACCA GTCGCGATCT  
 GTACTTGCCT GTGCTGACCA GTGGTACAAA TTCGGCCC

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Gly Lys  
 Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp  
 Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val  
 Trp Glu Asn Thr Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys  
 Phe Gly

#### A.1. Gracilariopsis lemaneiformisの細胞学的検討

##### A.1.1.1 Gracilariopsis lemaneiformisにおける菌類感染の検出

中国で収集した *Gracilariopsis lemaneiformis* の切片は手で切断するかまたはパラフィン包埋した試料から切断した。切片化した試料を光学顕微鏡で注意深く検討した。菌類菌糸は *Gracilariopsis lemaneiformis* 内に明確に検出された。

*Gracilariopsis lemaneiformis* の葉状体は、高度に整然として、ほぼ対象の特徴を示す細胞から成る。*lemaneiformis* の管状葉状体は大きい、無色の中心細胞、ならびにその周囲に伸長された、細長い楕円形の細胞、および小さい、丸い、赤く着色された周辺細胞から成る。全ての藻類細胞タイプは厚い細胞壁により特性づけられる。ほとんどの菌類菌糸は、大きな細胞の中心層および周辺層の中間相に見出される。これらの細胞は長く円筒形であるため藻類細胞と明確に区別し得る。菌糸の成長は、高度に整然とした藻類細胞の間の不規則性として観察された。最も頻繁な菌糸の方向は、藻類の葉状体の主軸に沿った向きである。中心および周辺に向かう側枝がいくつかの場合で検出される。菌糸は藻類の内性／着生第二世代と混同され得ない。

Calcofluor Whiteはキチンおよびセルロースを含有する組織を染色することが

知られている。キチンとの反応は、4個の共有結合した末端のn-アセチルグルコ

サミン残基を要求する。セルロースは、いくつかの藻類では微量に存在し得るが、ほとんど高等植物に限定されていることが一般に受け入れられている。さらにキチンは*Gracilaria*内には存在しないことが公知である。

Calcofluor Whiteは切片化した*Gracilariopsis lemaneiformis*の試料中の菌類菌糸の細胞壁に相当する領域を染色することが見出された。

紫外線下で観察すると、菌糸は*Gracilaria*組織の淡青色の背景に対して明確な白色を示す(図1を参照のこと)。キチンは*Gracilaria*には存在しないが、ほとんどの菌類においては細胞壁の主成分である。これらの観察に基づき、本発明者らは検査した藻類は菌類に感染していると結論する。検討した*Gracilariopsis lemaneiformis*切片の下部の40%は、菌類菌糸に感染していることが見出された。藻類の先端では検査した*Gracilariopsis lemaneiformis*の切片の25%が感染していることが見出された。

Periodic acid Schiff (PAS) およびAniline blue blackでの*Gracilariopsis lemaneiformis*切片の染色は、藻類細胞と比較して菌類細胞内の顕著に高い炭水化物含有を示した(図2を参照のこと)。Safranin OおよびMalachit Greenは、菌類に感染した高等植物に見出されるのと同じ菌類細胞の呈色反応を示した。

Acridin Orangeと*Gracilariopsis lemaneiformis*切片との反応は、明確に菌類の不規則な成長を示した。

#### A.1.1.2 電子顕微鏡検査

Calcofluor Whiteを用いて菌類を検出した、15 $\mu$ mの厚さの切片を有するスライドを2% OSO<sub>4</sub>で固定し、水で洗浄し、そしてジメトキシプロパンと無水アルコールで脱水した。アセトンとSpurr樹脂の1:1混合液の一滴をガラススライド上の各々の切片に滴下し、そして1時間後純粋な樹脂の一滴で置き換えた。樹脂を充填したゼラチン包埋カプセルを切片の表面に静置し4℃で一晩放置した。55℃で8時間重合した後、樹脂ブロックに付着した厚い切片は、液体窒素に浸すことによりスライドから分離され得た。

ブロックの形を整え、ミクロトーム上でダイヤモンドナイフを用いて、100nmの厚さの切片を切断した。切片を酢酸ウラニル水溶液およびクエン酸鉛で染色し

た。切片を電子顕微鏡内で、80kVで検討した。

この検査は光学顕微鏡での観察を確認し、リアーゼを生産する中国の株の *G. lemaneiformis* が菌類の寄生体あるいは共生体に感染しているというさらなる証拠を提供した。

菌類菌糸は、長さ50-100 $\mu$ mおよび直径僅か数ミクロンの管状細胞から作られている。この細胞は隣接した細胞の間の隔壁で連続的に整列されている。時折分枝も見られる。菌糸は、壁を貫通したり細胞を損傷したりすることなく藻類葉状体の厚い細胞壁の間に成長する。このような共生関係 (mycophycobiosis と呼ばれる) はいくつかの糸状海洋菌類および大きな海藻間で起こることが知られている (Donk および Bruning, 1992- 藻類中、および藻類上での水生菌類の生態学。Reisser, W. (編): *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Biopress Ltd., Bristol.)

図10の顕微鏡写真を検討すると、藻類細胞および菌類細胞の間のいくつかの違いに気が付く。藻類の数 $\mu$ mの厚さの壁と対照的に、菌類の細胞壁は僅か100~200nmの厚さである。チラコイド膜を有するクロロプラストおよび紅藻デンプン粒子のような植物に典型的なオルガネラが、藻類細胞内には見られ得るが、菌類内には見られない。

紅藻類の細胞間の連結は壁孔プラグ (pil plug) あるいは壁孔連絡と呼ばれる特異的な構造により特徴付けられる。この構造は突起した、電子密核 (electron dense core) であり、それらは藻類分類学において重要な特徴である (Pueschel, C.M.: 紅藻類の壁孔プラグの超構造の拡張した概観。J. Phycol. 25, 625 (1989))。本発明者らの試料では、このような連絡は頻繁に藻類葉状体内で観察された。しかし、菌類の細胞の間には全く見られなかった。

#### A.1.2 インサイチュハイブリダイゼーション実験

インサイチュハイブリダイゼーション技術はアンチセンスリボヌクレオチド配列の mRNA へのハイブリダイゼーションの原理に基づく。この技術は mRNA が存在する顕微鏡切片中の領域を視覚化するために用いられる。この特定の場合、この技

術を *Gracilariopsis lemaneiformis* 切片中の酵素  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを局

在化するために用いた。

#### A.1.2.1 インサイチュハイブリダイゼーションのための<sup>32</sup>S 標識したプローブの調製

第3のPCR増幅からの238 bp (クローン2と呼ばれる (前記参照)) を pGEM-3Z f(+)ベクター (Promega) にクローン化した。アンチセンスRNAの転写はSP6プロモーターで駆動し、センスRNAの転写はT7プロモーターで駆動した。Ribonuclease protection assay kit (Ambion) を以下のとおり改変して使用した。転写産物を6%シーケンシングゲルで泳動して、取り込まれていないヌクレオチドを除去し、T7RNA polymerase in vitro Transcription Kit (Ambion) で提供される溶出緩衝液で溶出した。アンチセンス転写産物は23の非コードヌクレオチドを含み、一方センス転写産物は39の非コードヌクレオチドを含んでいた。ハイブリダイゼーションのために10<sup>7</sup> cpm/mlの<sup>32</sup>S 標識したプローブを用いた。

インサイチュハイブリダイゼーションは本質的にLangedaleら (1988) に記載のように実施した。ハイブリダイゼーションの温度は45℃が至適であることが見出された。45℃で洗浄した後、切片をKodak K-5 photographic emulsionで覆い、3日間5℃で暗所に放置した (Langedale, J.A., Rothermel, B.A. および Nelson, T. (1988). Genes and development 2: 106-115. Cold Spring Harbour Laboratoryを参照)。

α-1,4-グルカンリアーゼのmRNAに対するリボプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーション実験は、Gracilariopsis lemaneiformis内に検出された菌類の菌糸の上面および周辺に強いハイブリダイゼーションを示した (図4および5参照)。これはα-1,4-グルカンリアーゼが生産されていることを示す強い証拠であると考えられる。弱いランダムなバックグラウンド反応を両方のGracilariopsis lemaneiformisの藻類組織で検出した。この反応は、センスおよびアンチセンス両方のプローブについて観察された。菌類菌糸の上面の強い染色はアンチセンスプローブを用いたときにのみ得られた。

これらの結果はハイブリダイゼーションおよび洗浄の工程における45℃での標準的なハイブリダイゼーションの条件を用いて得られた。50℃では菌類の上面の

染色は観察されなかったが、バックグラウンドの染色は同様であった。55℃に温度を上げることにより、センスおよびアンチセンスプローブの両方で、有意にかつ等しくバックグラウンドの染色が減衰した。

相補的染色手順を用いた細胞学的検査に基づき、*Gracilariopsis lemaneiformis*は菌類に感染していることが結論される。感染は、藻類組織の下部において最も顕著である。

切片化した*Gracilariopsis lemaneiformis*試料において、インサイチュハイブリダイゼーションの結果は、ハイブリダイゼーションが菌類の感染が見い出される領域に限定されていることを明確に示す(図4参照)。この結果は $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼのmRNAが*Gracilariopsis lemaneiformis*の菌類に感染した領域に限定されているように見えることを示す。これらの観察に基づき、本発明者らは菌類に感染した*Gracilariopsis lemaneiformis*内に $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ活性が検出されると結論する。

#### A.2. 酵素の精製と特徴付け

菌類に感染した*Gracilariopsis lemaneiformis*由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの精製は以下のように実施した。

##### A.2.1 材料と方法

藻類は濾過により回収し、0.9% NaClで洗浄した。細胞をホモゲナイゼーションによって破壊し、次いで氷上で6×3分間、50mMクエン酸-NaOH pH6.2(緩衝液A)中で超音波破碎した。細胞破片(debris)は25,000×g、40分間遠心して取り除いた。この手順で得られた上清を無細胞抽出物とみなし、8~25%の勾配ゲルで分離した後、活性染色およびウエスタンブロッティングに用いた。

##### A.2.2 $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseゲルによる分離

無細胞抽出物をあらかじめ緩衝液Aで平衡化した $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseゲル4Bカラム(2.6×18cm)に直接かけた。このカラムを3倍量の緩衝液Aおよび1M NaClを含む2倍量の緩衝液Aで洗浄した。 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを緩衝液A中の2%デキストリンを用いて溶出した。活性のある画分をプールし緩衝液を20mMピストリスプロパン-HCl(pH7.0, 緩衝液B)に変えた。

活性のある画分をあらかじめ緩衝液Bで平衡化したMono Q HR5/5カラムにかけた。菌類のリアーゼを0.3M NaClの直線勾配で緩衝液Bを用いて溶出した。

$\beta$ -シクロデキストリンSephacroseクロマトグラフィーの後に得られたリアーゼ調製物は、あるいは150 $\mu$ lに濃縮し、FPLC条件下で操作されたSuperose12カラムにかけた。

A.2.3  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイならびに基質特異性、至適pH、および至適温度決定のための条件

$\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイのための反応混合液は10mg/mlアミロペクチンおよび25mM Mes-NaOH(pH6.0)を含んだ。反応は30℃で30分間行い、3,5-デニトロサリチル酸試薬を加えて停止した。光学密度は、室温で10分間おいた後に550nmで測定した。

#### A.3. 菌類感染Gracilariopsis lemaneiformis由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼのアミノ酸配列決定

##### A.3.1 リアーゼのアミノ酸配列決定

リアーゼをClostridium histolyticum由来のエンドプロティナーゼArg-CまたはLysobacter enzymogenes由来のエンドプロティナーゼLys-Cのいずれかで消化した。いずれも配列決定用グレードであり、Boehringer Mannheim, Germanyから購入した。エンドプロティナーゼArg-Cでの消化のために、凍結乾燥したリアーゼ(0.1mg)を50 $\mu$ lの10M尿素、50mMメチルアミン、0.1M Tris-HCl、pH7.6に溶解した。 $N_2$ で覆い、10 $\mu$ lの50mM DTTおよび5mM EDTAを添加し、 $N_2$ 下50℃で10分間、タンパク質を変性および還元させた。続いて、10 $\mu$ lの50mM Tris-HCl、pH8.0中の1 $\mu$ gのエンドプロティナーゼArg-Cを添加し、 $N_2$ で覆い、消化を37℃で6時間行なった。次のシステインの誘導体化のために、12.5 $\mu$ lの100mMヨードアセトアミドを添加し、 $N_2$ 下、暗所で室温、15分間インキュベートした。

エンドプロティナーゼLys-Cでの消化のために、凍結乾燥したリアーゼ(0.1mg)を50 $\mu$ lの8M尿素、0.4M  $NH_4HCO_3$ 、pH8.4に溶解した。 $N_2$ で覆い、5 $\mu$ lの45mM DTTを添加した後、 $N_2$ 下50℃で15分間、タンパク質を変性および還元させた。室温まで冷却した後、5 $\mu$ lの100mMヨードアセトアミドを添加して、 $N_2$ 下、暗所で室温

、15分間システインを誘導体化した。

次に、90 $\mu$ lの水および50 $\mu$ lの50mM tricineおよび10mM EDTA、pH8.0中の5 $\mu$ gのエンドプロテイナーゼLys-Cを添加し、消化をN<sub>2</sub>下37℃24時間行った。

この結果生じたペプチドを溶媒A(水中の0.1%TFA)および溶媒B(アセトニトリル中の0.1%TFA)を用いて、VYDAC C18カラム(0.46 $\times$ 15cm; 10 $\mu$ m; The Separations Group; California)上の逆相HPLCに分離した。選択したペプチドをパルス化高速液体サイクル(pulsed-liquid fast cycles)を用いてApplied Biosystems 476Aシーケンサーによって配列決定する前に、Develosil C18カラム(0.46 $\times$ 10cm; 3 $\mu$ m; Dr.Ole Schou, Novo Nordisk, Denmark)で再クロマトグラフした。

菌類に感染した*Gracilariopsis lemaneiformis*由来の酵素からのアミノ酸配列情報を以下、特に配列番号1、および配列番号2に示す。

配列番号1は以下を有する：

アミノ酸残基数：1088

アミノ酸組成(シグナル配列を含む)

=====

61 Ala	15 Cys	19 His	34 Met	78 Thr
51 Arg	42 Gln	43 Ile	53 Phe	24 Trp
88 Asn	53 Glu	63 Leu	51 Pro	58 Tyr
79 Asp	100 Gly	37 Lys	62 Ser	77 Val

配列番号2は以下を有する：

アミノ酸残基数：1091

アミノ酸組成(シグナル配列を含む)

=====

58 Ala	16 Cys	14 His	34 Met	68 Thr
57 Arg	40 Gln	44 Ile	56 Phe	23 Trp
84 Asn	47 Glu	69 Leu	51 Pro	61 Tyr
81 Asp	102 Gly	50 Lys	60 Ser	76 Val

研究により天然のグルカンリアーゼ1のN-末端配列がブロックされていることが示された。脱ブロック化を本質的にLeGendreら(1993)[タンパク質およびペプチドのSDS-PAGEによる精製; Matsudaira, P. (編) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing, 第2版; Academic Press Inc., San Diego; pp. 74-101]に記載の方法に従い、PVDF膜にプロットされたグルカンリアーゼ1を無水TFAで40℃で30分間処理することにより達成した。得られた配列はTALSDKQTAであった。これはグルカンリアーゼ1のクローン由来の配列(配列番号1の51位~59位の配列)と一致し、グルカンリアーゼ1のN-末端残基がN-アセチルスレオニンであることを示す。配列番号1の1位~50位の配列はシグナル配列を表す。

#### A.4. 菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子のDNA配列決定

##### A.4.1 分子生物学のための方法

以下の改変を加えてSaunders(1993)に記載の方法のようにDNAを単離した: ポリサッカライドを、DNAからゲル精製のかわりにELUTIP-d(Schleicher & Schuell)精製により除去した(Saunders, G.W. (1993). 紅藻類ゲノムDNAのゲル精製: PCRに有用なDNAを単離するための、安価で迅速な方法。Journal of phycology 29(2): 251-254およびSchleicher & Schuell: ELUTIP-d. DNAの精製および濃縮のための迅速な方法。を参照のこと)。

##### A.4.2 PCR

目的のDNAの調製は、Gene Amp DNA Amplification Kit(Perkin Elmer Cetus, USA)を使用し、Taqポリメラーゼを後に加え(PCRサイクルを参照のこと)、温度サイクルを以下のように変更した以外は製造業者の使用説明書に従い行った:

PCRサイクル:

サイクル数	C	時間(分)
1	98	5
	60	5
Tagポリメラーゼ および油の添加		
35	94	1
	47	2
	72	3
1	72	20

#### A.4.3 PCRフラグメントのクローニング

PCRフラグメントは製造業者の使用説明書に従い pT7Blue (Novagen) にクローニングした。

#### A.4.4 DNA配列決定

二本鎖DNAはSangerら(1979)のジデオキシ法に本質的に従い、Auto Read Sequencing Kit (pharmacia) および Pharmacia LKB A.L.F. DNAシーケンサー(参考: Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A.R. (1979). 鎖終結インヒビターを用いたDNA配列の決定 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.)を用いて配列決定を行った。

配列を配列番号1および2として示す。簡潔に記載すると:

配列番号3は以下を有する:

総塩基数: 3267。

DNA配列組成: 850 A; 761 C; 871 G; 785 T

配列番号4は以下を有する:

総塩基数: 3276。

DNA配列組成: 889 A; 702 C; 856 G; 829 T

#### A.4.5 ライブラリーのスクリーニング

Stratageneより得た、1Zapライブラリーのスクリーニングを、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを $2\times$ SSC、0.1%SDS、 $10\times$ Denhardt's および $100\mu$ g/ml変性サケ精子DNA中で行った以外は製造者の使用説明に従って行った。ハイブリダイゼーション溶液に $^{32}$ Pで標識した変性プローブを添加した。

。ハイブリダイゼーションは55℃で1晩行った。フィルターを2×SSC、0.1%SDS中で2回、および1×SSC、0.1%SDS中で2回洗浄した。

#### A.4.6 プローブ

クローン化したPCRフラグメントを、適切な制限酵素を用いた消化により、pT7 blueベクターから単離した。フラグメントをアガロース電気泳動によってベクターから分離し、フラグメントをAgarase(Boehringer Mannheim)によってアガロースから精製した。フラグメントはわずか90~240bpの長さであったのでPrime-It random primer Kit(Stratagene)またはReady to Go DNA labelling kit(pharmacia)を用いて<sup>32</sup>P-dCTPで標識する前にライゲーション反応に暴した。

#### A.4.7 結果

##### A.4.7.1 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードするPCR DNAフラグメントの生成

$\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ由来の、3つの重複するトリプシンペプチドのアミノ酸配列(下に示す)を、混合オリゴヌクレオチドを生成するために用いた。このオリゴヌクレオチドはMCおよびMVの両方から単離したDNAを増幅するためのPCRプライマーとして用いられ得た(前記の配列を参照)。

第1のPCR増幅において、プライマーA/B(前記参照)を上流のプライマーとして、プライマーC(前記参照)を下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは71塩基対である。

第2のPCR増幅において、プライマーA/Bを上流のプライマーとして、プライマーEを下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは161塩基対である。

第3のPCR増幅において、プライマーF1(前記参照)およびプライマーF2(前記参照)を上流のプライマーとして、プライマーEを下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは238塩基対である。

このPCR産物を2% LMTアガロースゲルで分析し、予想される長さのフラグメントをゲルから切り出して、Agarase(Boehringer Mannheim)で処理し、そしてpT7 blueベクター(Novagen)にクローン化して配列決定した。

第1および第2のPCR増幅由来のクローン化したフラグメントは、配列決定し

たペプチド（前記参照）に相当するアミノ酸をコードしていた。第3の増幅由来のクローン（前記参照）は配列決定したペプチドに対して約87%のみ相同であった。

A.4.7.2 クローン化したPCRフラグメントを用いたゲノムライブラリーのスクリーニング。

前記したクローンを用いたライブラリーのスクリーニングにより、2つのクローンを得た。1つのクローンは配列番号4（遺伝子2）のヌクレオチド配列を含有した。他のクローンは配列番号3の配列の一部を含有した（塩基対1065から下流）（遺伝子1）。

配列番号3の5'末端（すなわち塩基対1064から上流）はGibco BRLの5' race systemを用いたRACE（rapid amplification of cDNA ends）手順（Michael, A. F., Michael, K.D.およびMartin, G.R. (1988). Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:8998-99002）により得た。全RNAをCollingeら（Collinge, D.B., Milligan D.E., Dow, J.M., Scofield, G.およびDaniels, M.J.(1987). Plant Mol Biol 8: 405-414）に従い単離した。5' raceは、1  $\mu$ gの全RNAを用いて、製造業者のプロトコルに従い実施した。第2の増幅由来のPCR産物をNovagenのpT7blue vectorに製造業者のプロトコルに従いクローン化した。PCRエラーを補償するために3つの独立したPCRクローンを塩基配列決定した。

上で記載のクローンにATG開始コドンの直前のXbaIおよびNdeI制限部位を補足するために以下のオリゴヌクレオチドを上流のプライマーに用いて：

GCTCTAGAGCAATGTTTTCAACCCCTTGCG、そして配列GLI（すなわち配列番号3）の塩基対1573-1593の相補配列を含むプライマーを下流のプライマーとして用いて、追加のPCRを実施した。

遺伝子1の完全な配列（すなわち配列番号3）はStratageneのpBluescript II KS+ベクターに遺伝子の3'末端をゲノムクローン由来のBamHI-HindIIIフラグメントとしてクローン化し、そしてさらにPCRにより生成した遺伝子の5'末端をXbaI-BamHIフラグメントとして3'末端の前にクローン化することにより生成した。

遺伝子2を、HindIII平滑末端化フラグメントとしてStratageneのpBluescript II KS+ベクターのEcoRV部位にクローン化した。3'非転写配列の一部をSacI消化により除去し、次に再結合した。HindIIIおよびHpaI制限部位を開始ATGの直前に、HindIIIおよびNarI消化、および以下のアニールしたオリゴヌクレオチドの存在下での再結合により導入した。

AGCTTGTTAACATGTATCCAACCCTCACCTTCGTGG  
ACAATTGTACATAGGTTGGGAGTGAAGCACCGC

配列決定したクローン内にイントロンを見出さなかった。

クローン1タイプ(配列番号3)を10のペプチド配列全てと(図8参照)100%の同一性を示して、並べ得る菌類に感染した*Gracilariaopsis lemaneiformis*から単離された遺伝子によりコードされる二つのタンパク質の配列のアライメントは約78%の同一性を示した。これは両方の遺伝子が $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードすることを示す。

#### A. 5 微生物におけるGL遺伝子の発現

(例えば、*Pichia*のリアーゼ形質転換体および*Aspergillus*のリアーゼ形質転換体の分析)

GLをコードするDNA配列を微生物に導入し、高い比活性を有する酵素を大量に生産した。

これに関して、遺伝子1(すなわち配列番号3)を*Pichia pastoris*で発現させるために(Invitrogenにより供給される*Pichia* Expression Kit中に記載のプロトコールに従って)*Pichia*発現ベクターpHIL-D2(AOX1プロモーターを含有する)をEcoRIで消化し平滑末端化(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)したものに、NotI-HindIII平滑末端化(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)フラグメントとしてクローン化した。

別の実施態様では、遺伝子1(すなわち配列番号3)は、*Aspergillus niger*で発現させるために(Pallら、(1993)Fungal Genet Newslett. vol40 pages 59-62)、*Aspergillus*発現ベクターpBARMTE1(*Neurospora crassa*由来のメチルトリプトファン耐性プロモーターを含有する)をSmaIで消化したものに、NotI-HindIII平

滑末端化フラグメント(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)としてクローン化した。プロトプラストはDaboussiら(Curr Genet(1989)Vol 15 pp453-456)に従って溶解(lysing)酵素Sigma L-2773およびリティカーゼ(lyticase)Sigma L-8012を使用して調製した。プロトプラストの形質転換はBuxtonら(Gene(1985) vol37 pp207-214)に記載のプロトコルに従ったが、形質転換したプロトプラストのプレーティングに関しては、0.6%の浸透圧安定化トッブアガロースを使用した以外はPuntら(Methods in Enzymology (1992) vol216 pp447-457)により立案されたプロトコルに従った。

結果は、形質転換した*Pichia pastoris*および*Aspergillus niger*においてリアーゼ活性が観察されたことを示した。

#### A.5.1 一般的方法

##### 無細胞抽出物の調製

細胞を9000rpm、5分間遠心することによって回収し、0.9%NaClで洗浄し、破碎(breaking)緩衝液(1mM EDTA、および5%グリセロール含有50mM K-リン酸、pH7.5)に再懸濁した。細胞はガラスビーズおよびボルテックス処理を用いて破碎した。破碎緩衝液は1mMのPMSF(プロテアーゼインヒビター)を含有した。リアーゼ抽出物(上清)を、9000rpmで5分間遠心し、次いで20,000×gで5分間遠心後得た。

アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬(DNS)によるリアーゼ活性のアッセイ

リアーゼ抽出物の1倍量を等量の4%アミロペクチン溶液と混合した。反応混合液は制御された温度でインキュベートし、そして試料は特定の間隔で取り出しAFについて分析した。

リアーゼ活性はまた、放射活性方法を使用して分析した。

反応混合液は、10μlの<sup>14</sup>C-デンプン溶液(1μCi; Sigma Chemicals Co.)および10μlのリアーゼ抽出物を含有した。反応混合液は25℃で1晩おき、その後通常のTLC系で分析した。生成された放射活性AF産生量はInstant Imager(Pachard Instrument Co., Inc., Meriden, CT)を用いて検出した。

##### 電気泳動およびウェスタンブロッティング

SDS-PAGEは8~25%勾配ゲルおよびPhastSystem(Pharmacia)を使用して行った。

ウェスタンブロッティングもPhastSystemのSemidry transfer unitで実施した。

Qingdao(中国)で採取された紅海藻から精製されたリアーゼに対してもたらされた1次抗体を1:100に希釈して使用した。アルカリホスファターゼ(Dako A/S, Glostrup, Denmark)に結合したブタ抗ウサギIgGを2次抗体として使用し、1:1000に希釈して使用した。

パート1、前記構築物を含有するPichia形質転換体の分析

結果：

1. リアーゼ活性を誘導後5日目に測定し(手引き書に従い)、Bシリーズの全ての試料について活性が細胞内であることが判明した。

Bシリーズの試料	11	12	13	15	26	27	28	29	30
----------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

比活性	139	81	122	192	151	253	199	198	150
-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

\*比活性は、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中の2%(w/v)グリコーゲン、1%(w/v)グリセロールを含有する反応混合液中でmgタンパク質あたり、1分あたりに放出されるnmol AFとして定義する。反応温度は45℃であり；反応

時間は60分であった。

試料B27の経時変化は以下のとおりである。データをまた、図1に示す。

時間(分)	0	10	20	30	40	50	60
比活性	0	18	54	90	147	179	253

アッセイの条件は時間の変化を除いて上記と同様である。

2. ウェスタンブロット分析

全ての試料のCFEは天然のリアーゼに相当する分子量を有するバンドを示した

---

*Pichia pastoris* において細胞内で発現されたMC-リアーゼ

---

培養物の名称	比活性
A18	10
A20	32
A21	8
A22	8
A24	6

---

パートII、*Aspergillus*形質転換体

結果

I. リアーゼ活性は、5日間のインキュベーション(0.2%カゼイン酵素的加水分解産物を含む最少培地)の後、アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬による分析で測定した。

1) 培養液のリアーゼ活性の分析

0.2%アミロペクチンとともに増殖させた35の培養物の中で、AFは2つの培養物でのみ検出された。5.4+および5.9+の培養物はそれぞれ0.13g AF/リットルおよび0.44g/リットルを含有していた。この結果は活性なリアーゼが細胞から分泌されていることを示した。リアーゼ活性はまた、無細胞抽出物中에서도また測定可能であった。

2) 無細胞抽出物におけるリアーゼ活性の分析

培養物の名称	比活性 *
5.4+	51
5.9+	148
5.13	99
5.15	25
5.19	37

\* 比活性は25℃におけるAF産生のnmol/分/mgタンパク質で定義される。+は0.2% アミロペクチンを添加したことを示す。

結果はGLの遺伝子1がA.nigerにおいて細胞内で発現したことを示す。

形質転換したE.coliを用いた実験は(QiagenのQia express vector kitのクロニングベクターpQE30を用いた)、酵素の発現を示し、この酵素は菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis由来の精製した酵素に対する抗体により認識された。

#### B. 供給源 = 菌類

##### B.1. 菌類 Morchella costata 由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの酵素精製および特徴付け

###### B.1.1 材料と方法

菌類 Morchella costata は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)から得た。この菌類はATCCにより推奨される培養培地を使用して25℃で振とう培養した。菌糸体は濾過により回収し、0.9%NaClで洗浄した。

菌類細胞をホモゲナイゼーションによって破壊し、次いで氷上で6×3分間、50 mMクエン酸-NaOH pH6.2(緩衝液A)中で超音波破碎した。細胞破片(debris)は25,0

00×g、40分間遠心して取り除いた。この手順で得られた上清を無細胞抽出物とみなし、8～25%の勾配ゲルで分離した後、活性染色およびウエスタンブロッティングに用いた。

#### B.1.2 $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseゲルによる分離

無細胞抽出物をあらかじめ緩衝液Aで平衡化した $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseゲル4Bカラム(2.6×18cm)に直接かけた。このカラムを3倍量の緩衝液Aおよび1M NaClを含む2倍量の緩衝液Aで洗浄した。 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼを緩衝液A中の2%デキストリンを用いて溶出した。活性のある画分をプールし緩衝液を20mMピストリスプロパン-HCl(pH7.0, 緩衝液B)に変えた。

活性のある画分をあらかじめ緩衝液Bで平衡化したMono Q HR 5/5カラムにかけた。菌類のリアーゼを0.3M NaClの直線勾配で緩衝液Bを用いて溶出した。 $\beta$ -シクロデキストリン Sepharoseクロマトグラフィーの後に得られたリアーゼ調製物は、あるいは150 $\mu$ lに濃縮し、FPLC条件下で操作されたSuperose12カラムにかけた。

#### B.1.3 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイならびに基質特異性、至適pH、および至適温度決定のための条件

$\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ活性のアッセイのための反応混合液は10mg/mlアミロペクチンおよび25mM Mes-NaOH(pH6.0)を含んだ。

反応は30℃で30分間行い、3,5-デニトロサリチル酸試薬を加えて停止した。光学密度は、室温で10分間おいた後に550nmで測定した。無細胞抽出物を使用する場合は、10mM EDTAをアッセイ混合液に加えた。

このアッセイ混合液の基質アミロペクチンは、他の基質で置換し得、反応温度は本文に記載したように変化し得る。

至適pH検討において、反応混合液は40mM緩衝液中の10mg/mlのアミロペクチンあるいはマルトテトラオースを含有する。使用した緩衝液は、グリシン-NaOH(pH2.0～3.5)、HOAc-NaOAc(pH3.5～5.5)、Mes-NaOH(pH5.5～6.7)、Mops-NaOH(pH6.0～8.0)、およびbicine-NaOH(pH7.6～9.0)であった。反応を、30℃で30分間行った。至適温度検討における反応条件は、すべての実験において緩衝液Mops-NaOH(

pH6.0)を使用したことを除いて、上記と同じである。反応温度は本文に示したように変化した。

SDS-PAGE、ネイティブ-PAGEおよび等電点電気泳動を、8~28%の勾配ゲルおよびpH3~9の勾配ゲルをそれぞれ使用して、PhastSystem(Pharmacia Sweden)で行った。電気泳動に続いて、ゲルを、製造業者(Pharmacia)により推奨される手順に従って銀染色で染色した。糖蛋白は、PhastSystemに適用したPASで染色した。活性染色のためには、電気泳動はネイティブな条件下で6℃で行った。

電気泳動に続いて、ゲルを1%可溶性デンプンの存在下で30℃で一晩インキュベートした。菌類のリアーゼの活性バンドは、I<sub>2</sub>/KI溶液を用いた染色により出現させた。

#### B.1.4 結果

##### B.1.4.1 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの精製、分子量および等電点

菌類のリアーゼは、 $\beta$ -シクロデキストリン Sepharose、デンプンおよび Red Sepharose を充填したカラムに吸着することが見出された。 $\beta$ -シクロデキストリン Sepharose 4Bゲルおよびデンプンを充填したカラムを、精製目的のために使用した。

この工程で得られたリアーゼ調製物は、菌類のリアーゼより高い分子量を有する少量の混入タンパク質を含んでいた。混入物は、Mono Q HR 5/5でのイオン交換クロマトグラフィー、またはより効率的に Superose 12でのゲル濾過により除去した。

精製した酵素は無色であり、可視光領域に吸光を示さなかった。分子量は、SDS-PAGEで見積もると、110kDaであると測定された。

精製した菌類のリアーゼは、3~9のpH勾配を有するゲルでの等電点電気泳動で測定するとpI 5.4の等電点を示した。ネイティブ電気泳動ゲルでは、この酵素は単一のバンドとして現れた。このバンドは、活性染色で検出したところ、デンプン分解活性を示した。酵素を抽出した培養期間の長さに依存して、ネイティブおよび等電点電気泳動ゲルでのこの酵素は、同一の移動度およびpIで、明瞭なバンドまたはより拡散したバンドを示した。

#### B.1.4.2 菌類のリアーゼが触媒する反応の至適pHおよび至適温度

菌類のリアーゼが触媒する反応の至適pHのpH範囲はpH5およびpH7の間であることが見出された。

#### B.1.4.3 基質特異性

精製した菌類のリアーゼは、マルトサッカリドをマルトースからマルトヘプタオースへ分解する。しかし、分解速度は変化する。最も高い活性はマルトテトラオース(100%としての活性)、続いてマルトヘサオソース(97%)、マルトヘプタオース(76%)、マルトトリオース(56%)で達成され、そして最も低い活性はマルトース(2%)で観察された。

アミロペクチン、アミロースおよびグリコーゲンはまだ、菌類のリアーゼにより分解された(%は後に測定する)。菌類のリアーゼは、エキソリアーゼであり、エンドリアーゼではなかった。なぜならこの酵素はp-ニトロフェニル $\alpha$ -D-マルトヘプタオースを分解するが、還元末端ブロックされたp-ニトロフェニル $\alpha$ -D-マルトヘプタオースを分解できなかったからである。

#### B.1.5 *Morchella vulgaris*

*Morchella vulgaris*から得られた $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの酵素精製および特徴付けのプロトコルは、*Morchella costata*についての上記と同じであった(結果も同様であった)。

#### B.2. 菌類由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼのアミノ酸配列決定

##### B.2.1 リアーゼのアミノ酸配列決定

リアーゼを*Clostridium histolyticum*由来のエンドプロティナーゼArg-Cまたは*Lysobacter enzymogenes*由来のエンドプロティナーゼLys-Cのいずれかで消化した。いずれも配列決定用グレードであり、Boehringer Mannheim, Germanyから購入した。エンドプロティナーゼArg-Cでの消化のために、凍結乾燥したリアーゼ(0.1mg)を50 $\mu$ lの10M尿素、50mMメチルアミン、0.1M Tris-HCl、pH7.6に溶解した。 $N_2$ で覆い、10 $\mu$ lの50mM DTTおよび5mM EDTAを添加し、 $N_2$ 下50℃で10分間、タンパク質を変性および還元させた。続いて、10 $\mu$ lの50mM Tris-HCl、pH8.0中の1 $\mu$ gのエンドプロティナーゼArg-Cを添加し、 $N_2$ で覆い、消化を37℃で6時間

行った。

次のシステインの誘導体化のために、12.5  $\mu$ lの100mMヨードアセトアミドを添加し、N<sub>2</sub>下、暗所で室温、15分間インキュベートした。

エンドプロテイナーゼLys-Cでの消化のために、凍結乾燥したリアーゼ(0.1mg)を50  $\mu$ lの8M尿素、0.4M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、pH8.4に溶解した。N<sub>2</sub>で覆い、5  $\mu$ lの45mM DTTを添加した後、N<sub>2</sub>下50℃で15分間、タンパク質を変性および還元させた。室温まで冷却した後、5  $\mu$ lの100mMヨードアセトアミドを添加して、N<sub>2</sub>下、暗所で室温、15分間システインを誘導体化した。次に、90  $\mu$ lの水および50  $\mu$ lの50mM tricineおよび10mM EDTA、pH8.0中の5  $\mu$ gのエンドプロテイナーゼLys-Cを添加し、消化をN<sub>2</sub>下37℃24時間行った。

この結果生じたペプチドを溶媒A(水中の0.1%TFA)および溶媒B(アセトニトリル中の0.1%TFA)を用いて、VYDAC C18カラム(0.46×15cm; 10  $\mu$ m; The Separations Group; California)上の逆相HPLCに分離した。選択したペプチドをパルス化高速液体サイクル(pulsed-liquid fast cycles)を用いてApplied Biosystems 47

6Aシーケンサーによって配列決定する前に、Develosil C18カラム(0.46×10cm; 3  $\mu$ m; Dr.Ole Schou, Novo Nordisk, Denmark)で再クロマトグラフした。

菌類 *Morchella costata* 由来の酵素のアミノ酸配列情報を図17に示す。

菌類 *Morchella vulgaris* 由来の酵素のアミノ酸配列情報を図18に示す。

### B.3. 菌類由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子のDNA配列決定

#### B.3.1 分子生物学のための方法

DNAはDellaportéら(1983-Plant Mol Biol Rep vol1 pp19-21)に記載のように単離した。

#### B.3.2 PCR

目的のDNA分子の調製は、Gene Amp DNA Amplification Kit(Perkin Elmer Cetus, USA)を使用し、Taqポリメラーゼを後に加え(PCRサイクルを参照のこと)、温度サイクルを以下のように変更した以外は製造業者の使用説明書に従った：

PCRサイクル：

サイクル数	C	時間 ( 分 )
1	98	5
	60	5
Tagポリマーゼおよび油の添加		
35	94	1
	47	2
	72	3
1	72	20

### B.3.3 PCRフラグメントのクローニング

PCRフラグメントは製造業者の使用説明書に従いpT7Blue(Novagen)にクローニングした。

### B.3.4 DNA配列決定

二本鎖DNAはSangerら(1979)のジデオキシ法に本質的に従い、Auto Read Sequencing Kit(Pharmacia)およびPharmacia LKB A.L.F.DNAシーケンサー(参考: Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A.R. (1979). 鎖終結インヒビターを用いたDNA配列の決定 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5497.)を用いて配列決定を行った。

### B.3.5 ライブラリーのスクリーニング

Stratageneより得た、lZapライブラリーのスクリーニングを、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを2×SSC、0.1%SDS、10×Denhardt'sおよび100μg/ml変性サケ精子DNA中で行った以外は製造者の使用説明に従って行った。

ハイブリダイゼーション溶液に32Pで標識した変性プローブを添加した。ハイブリダイゼーションは55℃で1晩行った。フィルターを2×SSC、0.1%SDS中で2回、および1×SSC、0.1%SDS中で2回洗浄した。

### B.3.6 プローブ

クローン化したPCRフラグメントを、適切な制限酵素を用いた消化により、pT7 blueベクターから単離した。フラグメントをアガロースゲル電気泳動によってベクターから分離し、フラグメントをAgarase(Boehringer Mannheim)によってアガ

ローズから精製した。フラグメントはわずか90~240bpの長さであったのでPrime-It random primer kit(Stratagene)またはReady to Go DNA labelling kit(Pharmacia)を用いて<sup>32</sup>P-dCTPで標識する前にライゲーション反応に曝した。

### B.3.7 結果

#### B.3.7.1 $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードするPCR DNAフラグメントの生成

$\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ由来の、3つの重複するトリプシンペプチドのアミノ酸配列(以下に示す)を、混合オリゴヌクレオチドを生成するために用いた。このオリゴヌクレオチドはMCおよびMVの両方から単離したDNAを増幅するためのPCRプライマーとして用いられ得た。

Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr Val Leu Asp Ile Val Lys  
Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly Glu Met Gly Gly Ile Gln Phe Met Lys  
Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr  
Ala Gln Gly Ala Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr

第1のPCR増幅において、プライマーA1/A2(下記参照)を上流のプライマーとして、プライマーB1/B2(下記参照)を下流のプライマーとして用いた。

プライマー A1: CA(GA)CA(CT)AA(GA)ATGCT(GATC)AA(GA)GA(CT)AC

プライマー A2: CA(GA)CA(CT)AA(GA)ATGTT(GA)AA(GA)GA(CT)AC

プライマー B1: TA(GA)AA(GATC)GG(GA)TC(GA)CT(GA)TG(GA)TA

プライマー B2: TA(GA)AA(GATC)GG(GA)TC(GATC)GA(GA)TG(GA)TA

PCR産物を2% LMTアガロースゲルで分析し、予想される長さのフラグメントをゲルから切り出して、Agarase(Boehringer Mannheim)で処理し、そしてpT7blueベクター(Novagen)にクローン化して配列決定した。

PCR増幅由来のクローン化フラグメントは、配列決定したペプチド(上記参照のこと)に対応するアミノ酸をコードしており、またそれぞれの場合でさらに2つのイントロンをコードしていた。MCについては、PCR増幅したDNA配列は、図14を参考にすると、1202位から1522位で示される配列に対応する。MVについては、PCR増幅したDNA配列は、図15を参考にすると1218位から1535位で示される配列に対応する。

B.3.7.2 クローン化したPCRフラグメントを用いたゲノムライブラリーのスクリーニング。

上記のクローンを用いたライブラリーのスクリーニングにより、それぞれの供給源で2つのクローンを得た。MCについては、2つのクローンを組み合わせて図14に示す配列を形成した(下記参照のこと)。MVについては、上に記載の方法により、2つのクローンを組み合わせて図15に示す配列を形成した。

MCクローンにATG開始コドンの直前のPstI、PvuII、AscI、およびNcoI制限部位を補足するために以下のオリゴヌクレオチドを上流のプライマーに用いて：

AAACTGCAGCTGGCGCGCCATGCGCAGGATTTTCTGAT、そして図4中の塩基対1297-1318の

相補配列を含むプライマーを下流のプライマーとして用いて、追加のPCRを実施した。

MCの完全な配列を、StratageneのpBluescript II KS+ベクターのBamHI-EcoRI部位に、遺伝子の5'末端をゲノムクローンの1つ(クローン1)由来のBglII-EcoRIフラグメントとしてクローン化することにより生成した。遺伝子の3'末端を、次に、修飾したpBluescript II KS+ベクターをEcoRIおよびEcoRVで消化した後、他のゲノムクローン(第2のクローン)からのNspV(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用して平滑末端化した)-EcoRIフラグメントと連結することにより、修飾したpBluescript II KS+ベクターにクローン化した。次に、遺伝子の中間部分を、EcoRIで消化したさらに修飾したpBluescript II KS+ベクターに、第1のクローンからのEcoRIフラグメントを連結することにより、さらに修飾したpBluescript II KS+ベクターにクローン化した。

#### B.4 微生物におけるGL遺伝子の発現

GLをコードするDNA配列を微生物に導入し、高い比活性を有する酵素を大量に生産し得る。

これに関して、MC遺伝子(図14)をPichia pastorisで発現させるために(Invitrogenにより供給されるPichia Expression Kit中に記載のプロトコールに従って)Pichia発現ベクターpHIL-D2(AOX1プロモーターを含有する)をEcoRIで消化し平滑末端化(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)したものに、Xb

al-XhoI平滑末端化(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)フラグメントとしてクローン化した。

別の実施態様では、MC遺伝子1(上記のようにPCRにより修飾して、制限部位を導入する以外は図14と同じである)は、*Aspergillus niger*で発現させるために(Pallら、(1993)Fungal Genet Newslett. vol40 pages59-62)、*Aspergillus*発現ベクターpBARMTE1(*Neurospora crassa*由来のメチルトリプトファン耐性プロモーターを含有する)をSmaIで消化したものに、PvuII-XhoI平滑末端化フラグメント(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)としてクローン化した。プロトプラストはDaboussiら(Curr Genet(1989)Vol 15 pp453-456)に従っ

て溶解(lysing)酵素Sigma L-2773およびリティカーゼ(lyticase)Sigma L-8012を使用して調製した。プロトプラストの形質転換はBuxtonら(Gene(1985) vol37 pp207-214)に記載のプロトコルに従ったが、形質転換したプロトプラストのプレーティングに関しては、0.6%の浸透圧安定化トッブアガロースを使用した以外はPuntら(Methods in Enzymology(1992) vol216 pp447-457)により立案されたプロトコルに従った。

結果は、形質転換した*Pichia pastoris*および*Aspergillus niger*においてリアーゼ活性が観察されたことを示した。

*Pichia*リアーゼ形質転換体および*Aspergillus*リアーゼ形質転換体の解析

一般的方法

無細胞抽出物の調製

細胞は9000rpm、5分間遠心することによって回収し、0.9%NaClで洗浄し、破碎(breaking)緩衝液(1mM EDTA、および5%グリセロール含有50mM K-リン酸、pH7.5)に再懸濁した。細胞はガラスビーズおよびボルテックス処理を用いて破碎した。破碎緩衝液は1mMのPMSF(プロテアーゼインヒビター)を含有した。リアーゼ抽出物(上清)を、9000rpmで5分間遠心し、次いで20,000×gで5分間遠心後得た。アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬(DNS)によるリアーゼ活性のアッセイ

リアーゼ抽出物の1倍量を等量の4%アミロペクチン溶液と混合した。反応混合液は制御された温度でインキュベートし、そして試料は特定の間隔で取り出しAF

について分析した。

リアーゼ活性はまた、放射活性方法を使用して分析した。

反応混合液は、10  $\mu$ l の  $^{14}$ C-デンプン溶液 (1  $\mu$  Ci; Sigma Chemicals Co.) および 10  $\mu$ l のリアーゼ抽出物を含有した。反応混合液は 25℃ で 1 晩おき、その後通常の TLC 系で分析した。生成された放射活性 AF 産生量は Instant Imager (Packard Instrument Co., Inc., Meriden, CT) を用いて検出した。

電気泳動およびウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は 8 ~ 25% 勾配ゲルおよび PhastSystem (Pharmacia) を使用して行った。ウェスタンブロッティングも PhastSystem の Semidry transfer unit で実施した。Qingdao (China) で採取された紅海藻から精製されたリアーゼに対してもたらされた 1 次抗体を 1:100 に希釈して使用した。アルカリホスファターゼ (Dako A/S, Glostrup, Denmark) に結合したブタ抗ウサギ IgG を 2 次抗体として使用し、1:1000 に希釈して使用した。

パート I、前記構築物を含有する Pichia 形質転換体の分析

*Pichia pastoris* における細胞内で発現されるリアーゼ

培養物の名称	比活性 *
A18	10
A20	32
A21	8
A22	8
A24	6

\* 比活性は25℃で1mg蛋白質あたり1分あたりに生成されるAFのnmol数として定義された。

#### パートII、*Aspergillus* 形質転換体

##### 結果

I. リアーゼ活性は、5日間のインキュベーション(0.2%カゼイン酵素的加水分解産物を含む最少培地)の後、アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬による分析で測定した。

無細胞抽出物中のリアーゼ活性の分析

培養物の名称	比活性 *
8.13	11
8.16	538
8.19	37

\* 比活性は25℃で1mg蛋白質あたり1分あたりに生成されるAFのnmol数として定義された。

結果はMCリアーゼが*A. niger*において細胞内で発現したことを示す。

#### II. 放射活性方法によるリアーゼ活性の試験

以下の培養物の無細胞抽出物が、 $^{14}\text{C}$  標識したAFを含有した。

51+, 54+, 55+, 59+, 512, 513, 514, 515, 516, 518, 519。

基質として $^{14}\text{C}$  デンプンを使用した $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼ反応の分解産物のTLCを、図20に示す。反応混合物をTLCにのせた。レーン番号は培養物の名称に対応する：1, 512; 2, 513; 3, 514; 4, 515; 5, 516; 6, 517; 7, 518; 8, 519; 9, 520。早く移動した点がAFである。

#### C. 供給源 = 藻類単独

*Gracilaria lemaneiformis* (Santa Cruzで得られた) から得られた $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの酵素精製および特徴付けのプロトコルは、本質的には前記のプロトコル、例えば*Morchella Costata*と同じである(結果も同様)。

#### 1. カリフォルニアで収集した寄生体のない紅海藻である*Gracilaria lemaneiformis*由来の $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼの特徴付け

リアーゼのアミノ酸組成を以下の表に示す。

アミノ酸残基                      それぞれの残基のモル%

---

Asx	15.42
Thr	5.24
Ser	6.85
Glx	9.46
Pro	5.46
Gly	9.08
Ala	5.38
1/2Cys	1.57
Val	6.60
Met	2.90
Ile	3.66
Leu	6.00
Tyr	6.00
Phe	4.37
His	1.65
Lys	4.44
Arg	4.17
Trp	1.75
総合 :	100.00

## 2. 配列解析

カリフォルニアの藻類のペプチド配列の、中国の菌類感染藻類のアミノ酸配列との比較は、2つのタンパク質配列の間の高い相同性（PCRフラグメントで生成したフラグメントのアミノ酸配列と、中国の藻類から得られたGLの対応する配列の間で78～80%同一）を示した。

3つのオリゴヌクレオチドを、カリフォルニアの藻類由来のこれら2つの配列から作成して、約970bpのPCRフラグメントを生成した。

プライマー 1: ATGAC(GATC)AA(CT)TA(CT)AA(CT)TA(CT)GA(CT)AA

プライマー 2: (AG)TG(GATC)GGCATCAT(GATC)GC(GATC)GG(GATC)AC

プライマー 3: GTCAT(GA)TC(CT)TGCCA(GATC)AC(GA)AA(GA)TC

第 1 の PCR 増幅において、プライマー 1 を上流のプライマーとして使用し、プライマー 2 を下流のプライマーとして使用した。第 2 の PCR 増幅において、プライマー 1 を上流のプライマーとして使用し、プライマー 3 を下流のプライマーとして使用した。期待されたサイズの PCR フラグメントが生成され、Novagen の pT7blue ベクターにクローン化された。PCR フラグメントを含む 3 つの独立したプラスミドを配列決定し、これらの 3 つのクローン化された PCR フラグメントが、3 つの異なるタンパク質に由来するペプチド配列のコドンを含むことが見出された。このことは、カリフォルニアの藻類には、少なくとも 3 つの異なる  $\alpha$ -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子が存在することを示す。

3. 最大速度の半分に達するときの基質濃度は、アミロペクチンで 3.76mg/ml およびグリコーゲンで 3.37mg/ml である。

4. 種々の基質でのリアーゼの分解速度を以下に示す。

基質	放出AF(nmol)
マルトース	657
マルトトリオース	654
マルトテトラオース	670
マルトペンタオース	674
マルトヘキサオース	826
マルトヘプタオース	865
デキストリン 20	775
デキストリン 15	775
デキストリン 10	844
アミロペクチン	732
グリコーゲン	592

反応条件：反応混合液は、10mMのH<sub>2</sub>OAc-NaOAc(pH3.8)を含有していた。基質濃度は10mg/mlであった。リアーゼおよび水を加えた後の最終容量は100 $\mu$ lであった。反応時間は45℃で40分であった。

リアーゼはブルラン、ニゲランテトラサッカリド、トレハロース、イソマルトース、グルコース、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -シクロデキストリンを分解し得なかった。リアーゼは、低速度でパノースおよびニゲロースを分解した。

5. リアーゼの至適温度は、アミロペクチンを基質とした時48℃であり、グリコーゲンを基質とした時50℃であった。50℃では、グリコーゲンの反応はアミロペクチンの反応と似ていた；50℃以下では、アミロペクチンはグリコーゲンよりも優れた基質であった。

6. リアーゼの至適pH範囲は、pH3.5およびpH7.0の間であった；至適pHは3.8であった。pH試験に用いた緩衝液は、グリシン-HCl(pH2.2~3.6)；NaOAc-HOAc(pH3.5~5.5)；Mes-NaOH(pH5.5~6.7)；Mops-NaOH(pH6.0~8.0)、およびbicine-NaOH(pH7.6~9.0)であった。すべての緩衝液は40mMであった。

7. 2mMの最終濃度で、p-クロロ安息香酸第二水銀(PCMB)は、リアーゼ活性を96%阻害し、酵素活性に-SH基が必須であることを示す。

#### 7. さらなる研究

##### 7.1 菌類感染藻類から精製したリアーゼの活性および

安定性の増加に及ぼすアルコールの影響

1-プロパノール、2-プロパノールおよび1-ブタノールを以下の濃度で試験した(0%、1%、5%、および10%)。1-プロパノールの至適濃度は5%であり、この濃度は6日間インキュベーション後のAF収量を34%増加した；2-プロパノールの至適濃度は1%であり、この濃度は10日間インキュベーション後のAF収量を20%増加した；1-ブタノールの至適濃度は5%であり、この濃度は3日間インキュベーション後のAF収量を52%増加した。

エタノールを以下の濃度で試験した(0、1、3、5、7、9、11、13、15%)。7日間インキュベーションの至適濃度は5%であり、この濃度はAF収量を12%増加した。10日間インキュベーションの至適濃度は3%であり、この濃度はAF収量を1

6%増加した。

1-プロパノールの影響：

1-アミノノール 濃度 (v/v)	反応時間 (日)				
	0	1	3	6	10
		AF 収量 (μmol)			
0%	0	84	261	451	689
1%	0	80	280	530	803
5%	0	115	367	605	853
10%	0	107	307	456	583

7.2 菌類感染藻類ならびに *M. costata* および *M. vulgaris* から精製したリアーゼによる AF の生成への異なった反応媒体の影響

### 2.1. 菌類感染藻類由来のリアーゼ

結果 (下の表を参照のこと) は、最も良好な反応媒体は mM 濃度の  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  を含有する 5 mM の  $\text{HOAc-NaOAc}$  (pH 3.9) (短縮して BACE) であることを示す。純水または 0.85% NaCl のいずれかを反応媒体として使用しての AF の生成は、収量を減少した。BACE 中に 0.85% NaCl を含有すると、AF の収量はまた減少した。

反応 媒体	反応時間 (日)			
	0	1	3	8
		AF 収量 (μmol)		
BACE	0	229	498	575
水	0	46	128	217
NaCl (0.85%)	0	123	239	249
BACE+NaCl (0.85%)	0	153	281	303

2.2. 以下の緩衝液:  $\text{Mes-NaOH}$ 、 $\text{Mops-NaOH}$ 、 $\text{Hepes-NaOH}$  および  $\text{Bicine-NaOH}$  は、*M. costata* および *M. vulgaris* 由来のリアーゼのための至適反応媒体であった。 $\text{HOAc-NaOAc}$  緩衝液中では、リアーゼは不安定であり、それゆえこの緩衝系の使用は、AF 収量の減少を引き起こした。

### 7.3. エンドアミラーゼおよび脱分枝酵素が AF 生成に及ぼす影響

#### 3.1. エンドアミラーゼの影響

AF 生成に使用されるデンプンは、まずエンドアミラーゼまたは酸加水分解のい

ずれかで液状化され得る。

エンドアミラーゼで分解されたデンプンは、もとのデンプンに比較してリアーゼのためのより適切な基質である。デンプンは、リアーゼ反応に使用する温度では、制限された溶解性を有する。デンプンをエンドアミラーゼで処理することにより、グルコース収量が増加に導かれた。10~15%付近（乾燥物質に基づいて）まで変換した物質（reducing matter）が、AFの収量という点からリアーゼのための基質として最も適しており、さらに19%の変換した物質までエンドアミラーゼを用いて処理することは、もはやこのリアーゼには適切ではないことが見出された。

### 3.2. プルラナーゼおよびイソアミラーゼの影響

下記の結果に見られるように、イソアミラーゼおよびプルラナーゼの両方は、AFの収量をpH4.5および5.0で50%まで増加させた。反応系は、イソアミラーゼまたはプルラナーゼ（MegaZyme Ltd.）を添加してまたは添加しないで、菌類に冒された紅藻類由来のリアーゼからなっていた。アミロペクチンを基質として使用した。リアーゼのみの存在下で生成されたAFを、100%として表した。

反応媒体の pH			
添加した酵素	3.5	4.5	5.0
リアーゼのみ	100	100	100
リアーゼ + イソアミラーゼ	136	152	150
リアーゼ + プルラナーゼ	132	158	155

## 4. 種々の基質に対する菌類のリアーゼの相対的分解速度

### 4.1. *M. costata* 由来のリアーゼ

マルトテトラオースで観察された活性を100%として表した。

基質濃度	2mg/ml	4mg/ml	10mg/ml
マルトース	0.5	1.6	2.2
マルトトリオース	40.6	58.6	56.0
マルトテトラオース	100	100	100
マルトペンタオース	107.1	100.1	99.7
マルトヘキサオース	86.6	98.2	95.9
マルトヘプタオース	82.2	81.5	75.7
デキストリン10*	-**	-	68.3
デキストリン15*	-	-	61.1
デキストリン20*	-	-	46.6
可溶性デンプン	-	-	92.9
アミロペクチン	-	-	106.5
グリコーゲン	-	-	128.5

\*数字は乾燥重量に基づいた変換した物質の含有量を示す。\*\*、測定せず。

#### 4.2.M.vulgaris由来のリアーゼ

マルトテトラオースで観察された活性を100%として処理した。すべての基質の最終濃度は10mg/mlであった。

基質	活性(%)
マルトース	10.1
マルトトリオース	49.8
マルトテトラオース	100.0
マルトペンタオース	79.3
マルトヘキサオース	92.4
マルトヘプタオース	73.9
デキストリン 10	62
デキストリン 15	45
デキストリン 20	37
可溶性デンプン	100.5
アミロペクチン	139.9
グリコーゲン	183.3

*M. costata* および *M. vulgaris* 由来のリアーゼは以下の糖を分解し得なかった。

トレハロース、パノース、ニゲロース、ニゲロテトラオース、グルコース、イソマルトース、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -シクロデキストリン、プルラナン (pullulan) ならびに非還元末端のブロックされた p-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-マルトヘプタ

オシド。なぜならこれらの基質を菌類のリアーゼとともに48時間インキュベートした後、TLCプレート上で検出可能なAFが存在しなかったからである。

#### 7.5. リアーゼ触媒反応の至適pHおよび至適温度

GL供給源	至適 pH	至適 pH範囲	至適温度
<i>M. costata</i>	6.5	5.5-7.5	37 C; 40 C <sup>a</sup>
<i>M. vulgaris</i>	6.4	5.9-7.6	43 C; 48 C <sup>a</sup>
菌類感染 <i>Gracilariaopsis</i> <i>lemaniformis</i>	3.8	3.7-4.1	40 C; 45 C <sup>a</sup>

<sup>a</sup> グリコーゲンを基質として使用して測定したパラメーター；他のパラメーターはアミロペクチンを基質として使用して測定した。

#### 7.6. 菌類感染 *Gracilariaopsis lemaneiformis* 由来のリアーゼに及ぼすグリコーゲンの安定化効果

結果は、アミロペクチンの代わりにグリコーゲンを使用した場合、より高い温度において反応速度がより高くなることを示す。

基質	反応温度		
	25 C	30 C	45 C
アミロペクチン	0.818 <sup>a</sup>	1.133 <sup>a</sup>	1.171 <sup>a</sup>
グリコーゲン	0.592 <sup>a</sup>	0.904 <sup>a</sup>	1.861 <sup>a</sup>
グリコーゲンおよびアミロペクチンの間の相対的反応速度の比率(%)			
	72.4	79.8	158.9

#### <sup>a</sup>、相対的反応速度

#### 7.7. リアーゼの分子量およびpI値

菌類感染 *G. lemaneiformis* 由来のリアーゼ、見かけ上菌類のない *G. lemaneiformis* 由来、*M. costata* および *M. vulgaris* 由来の両方の形態のリアーゼの分子量を、

勾配ゲル(8~25%)でのSDS-PAGEを使用して、 $110,000 \pm 10,000$ ダルトンと見積もった。

菌類感染 *G. lemaneiformis* 由来のリアーゼの pI は、3.9 付近であった。*M. vulgaris* 由来のリアーゼについては、pI は pH4.6 付近であり、*M. costata* 由来のリアーゼについての pI は 5.0 付近であった。これらの値は、3 から 9 の pH 勾配を有するゲルでの等電点電気泳動によって得られた。

アミノ酸組成から推定される pI 値は以下のとおりである：

菌類感染 *G. lemaneiformis* 由来のリアーゼ：4.58、および *M. costata* 由来のリアーゼ：6.30。

#### 7.8. ウェスタンブロッティングによるリアーゼの免疫学的試験。

結果は、藻類のリアーゼに対する抗体が、無細胞抽出物中および精製された形状の両方で、菌類のリアーゼを認識し得ることを示した。これはウェスタンブロッティングにより明らかとなった。中国で収集された藻類から精製された藻類のリアーゼに対する抗体は、カリフォルニアの Santa Cruz から収集された藻類のリアーゼも認識した。

GL供給源

菌類感染 *G. lemaneiformis* 由来の  
GLに対する抗体の反応性

菌類感染 *G. lemaneiformis*

強い

カリフォルニア由来の *G. lemaneiformis*

強い

両方の形態

*M. costata*

中程度

*M. vulgaris*

中程度

#### 7.9. 菌類のリアーゼの可逆的および非可逆的インヒビター

##### 9.1. 可逆的インヒビター、グルコースおよびマルトース

10mg/mlの基質濃度において、*M. costata*のリアーゼについての活性は、アミロ

ペクチンを基質として使用した場合、0.1 M グルコースの存在下で19.3%減少した；基質としてグリコーゲンをを用いた場合、活性は影響されなかった。0.1 M マルトースの存在下では、グリコーゲンおよびアミロペクチンについてそれぞれ48.8%および73.4%活性が減少した。

基質濃度	インヒビター	
	グルコース	マルトース
アミロペクチン 1%(2%)	19.3%(7%)	73.4%(67.2%)
グリコーゲン 1%(2%)	0.000(-)	48.8%(49.7%)

0.1M グルコースによる阻害は、基質を1%から2%に増加させると阻害が19.3%から7%に減少するため、拮抗的であるようだが、一方0.1 M マルトースによる阻害は、基質の増加が阻害程度に有意には影響しないため、非拮抗的である。

*M. vulgaris* のリアーゼについては、0.1 M グルコースおよびマルトースは、アミロペクチンまたはグリコーゲンを基質として使用した場合、反応を阻害しなかった。

基質	グルコース	マルトース
アミロペクチン(1%)	28%	80%
グリコーゲン(1%)	5%	57%

#### 9.2. 可逆的インヒビター、デオキシジリミシン

最終基質濃度2%において、活性は、アミロペクチンを基質として用いて、25  $\mu$ M のデオキシジリミシンの存在下で、藻類のリアーゼおよび *M. costata* のリアーゼについて10.4%に減少した。100  $\mu$ M では、どちらのリアーゼの活性も完全に失われた。

#### 9.3. 非可逆的インヒビター：PCMB

同じアッセイ条件下で、2 mMのPCMBの存在下で、活性は*M. costata*のリアーゼについては60%、および菌類感染紅藻類由来のリアーゼについては98%減少した。このことは、菌類のリアーゼは重金属阻害に対する感受性がずっと少ないということを示す。

#### 7.10. AFの研究室規模の生成実施例

##### 10.1. デキストリンを基質として使用したAFの生成

反応器は、4.6リットルの最終容量 (HOAc-NaOAc, pH3.9、5mM Na<sub>2</sub>-EDTAを含有する) 中に、1000gのデキストリン (デンプンをTermamylで10%の最終変換物質まで処理して得た) を含んだ。反応は、菌類感染藻類から精製した3 mgのリアーゼを添加することにより開始した。反応を室温で行った。19日目に、リアー

ゼの別のバッチ (4mg) を添加した。

---

反応時間 (日)						
0	1	7	13	19	24	31

---

生成したAF (μg)						
0	18	116	195	264	500	668

---

##### 10.2. <sup>14</sup>C-AFの生成のための<sup>14</sup>C-デンプンの使用

均一に標識した<sup>14</sup>C-デンプン (Sigmaから得た340 μCi) を、含有していたエタノールを除くために真空乾燥し、次に2 mlの水に溶解した。反応は、菌類感染藻類から精製した20 μlのリアーゼおよび20 μlのブルナーゼ (MegaZyme Ltd.) を添加することにより開始した。反応は30℃で一晩行った。反応終了時に、反応混合液を10,000の分子量カットオフを有するフィルターを使用して濾過して、酵素および未反応のデンプン分子を除去した。

濾液をWaters HPLCを使用してCa<sub>2</sub>カーボハイドレートカラム (Chrompack) にのせた。水を溶離剤として使用した。流速は0.5 ml/分であった。AFは、効率的にグルコースおよびマルトサッカリドから分離された。プールしたAF画分を凍結乾燥して、合計140 μCiの<sup>14</sup>C-AFを得た。

これらの知見は、本発明のさらなる局面に関連する。すなわち、反応媒体（好ましくはアルコール）の疎水性を増加させて、本発明のリアーゼの安定性および活性を増加し得る試薬の使用である。この安定性の増加は、AF収量を増加へ導く。

本発明の他の修飾は、発明の範囲から逸脱することなく、当業者に明らかである。

## 配列表

## (1) 一般的情報 :

## (i) 出願人 :

- (A) 名称 : ダニスコ エー/エス  
 (B) 番地 : ランゲプロガード 1  
 (C) 市 : コペンハーゲン  
 (D) 州 : コペンハーゲン ケー  
 (E) 国 : デンマーク  
 (F) 郵便番号 : DK-1001

(ii) 発明の名称 : 1,5-D-アンヒドロフルクトース調製のための  $\alpha$ -1,4-グルカンリ  
 アーゼの使用

(iii) 配列数 : 39

## (iv) コンピューター読み出し形態 :

- (A) 媒体型 : フロッピーディスク  
 (B) コンピューター : IBM PC互換用  
 (C) OS : PC-DOS/MS-DOS  
 (D) ソフトウェア : パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25(EPO)

## (v) 現在の出願データ :

出願番号 : WO PCT/EP94/03397

## (2) 配列番号1の情報 :

## (i) 配列の特色 :

- (A) 長さ : 1088アミノ酸  
 (B) 型 : アミノ酸  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号1 :

Met	Phe	Ser	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	1	5	10	15
Thr	Phe	Val	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Asn	Val	Arg	Ile	His	Ser	Ala	20	25	30	
Phe	Pro	Ala	Val	His	Thr	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Asn	Arg	Leu	Asn	Val	35	40	45	
Ser	Met	Thr	Ala	Leu	Ser	Asp	Lys	Gln	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	50	55	60	
Asp	Asn	Pro	Asp	Gly	Ile	Asp	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Val	Gly	Val	65	70	75	80
Trp	Gly	Phe	Ser	Pro	Leu	Ser	Asn	Thr	Asn	Trp	Phe	Ala	Ala	Gly	Ser	85	90	95	

Ser Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val Asn  
 100 105 110  
 Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Ile Thr Val Gln His Pro Val Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Val Thr Ser Tyr Asn Asn Asn Ser Tyr Arg Val Arg Phe Asn  
 130 135 140  
 Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Thr Arg Gly Pro Ile Leu Lys Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Asp Trp Ile Arg Thr Gln Glu Leu Ser Glu Gly Cys Asp Pro  
 165 170 175  
 Gly Met Thr Phe Thr Ser Glu Gly Phe Leu Thr Phe Glu Thr Lys Asp  
 180 185 190  
 Leu Ser Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg Lys  
 195 200 205  
 Ser Asp Gly Lys Val Ile Met Glu Asn Asp Glu Val Gly Thr Ala Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Ile Ala Ser Val Asn Lys Asn Phe Arg Asn Asp Ala Val Lys  
 245 250 255  
 Gln Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Lys Tyr Gln Asp  
 260 265 270  
 Thr Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr  
 275 280 285  
 Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro His His Asp  
 290 295 300  
 Gly Ala Leu Asn Pro Asp Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr Tyr Ala Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Trp Leu Ile Val Asn Gly Cys Ala Gly Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Tyr  
 325 330 335  
 Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Met Asn Thr Gly Asp  
 340 345 350  
 Thr Thr Trp Asn Ser Gly Gln Glu Asp Leu Ala Tyr Met Gly Ala Gln  
 355 360 365  
 Tyr Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Gly Ala Gly Gly Gly Met  
 370 375 380  
 Glu Cys Val Val Thr Ala Phe Ser Leu Leu Gln Gly Lys Glu Phe Glu  
 385 390 395 400

Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ser Val Met Pro Pro Lys Tyr Val Phe  
 405 410 415  
 Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Thr Ser Ser Leu Leu Arg Ala His  
 420 425 430  
 Met Pro Ala Gly Glu Asn Asn Ile Ser Val Glu Glu Ile Val Glu Gly  
 435 440 445  
 Tyr Gln Asn Asn Asn Phe Pro Phe Glu Gly Leu Ala Val Asp Val Asp  
 450 455 460  
 Met Gln Asp Asn Leu Arg Val Phe Thr Thr Lys Gly Glu Phe Trp Thr  
 465 470 475 480  
 Ala Asn Arg Val Gly Thr Gly Gly Asp Pro Asn Asn Arg Ser Val Phe  
 485 490 495  
 Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys Gln Thr Asn Ile Thr Cys  
 500 505 510  
 Phe Leu Arg Asn Asp Asn Glu Gly Gln Asp Tyr Glu Val Asn Gln Thr  
 515 520 525  
 Leu Arg Glu Arg Gln Leu Tyr Thr Lys Asn Asp Ser Leu Thr Gly Thr  
 530 535 540  
 Asp Phe Gly Met Thr Asp Asp Gly Pro Ser Asp Ala Tyr Ile Gly His  
 545 550 555 560  
 Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Val Glu Cys Asp Ala Leu Phe Pro Asp Trp  
 565 570 575  
 Gly Arg Pro Asp Val Ala Glu Trp Trp Gly Asn Asn Tyr Lys Lys Leu  
 580 585 590  
 Phe Ser Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln Asp Met Thr Val Pro Ala  
 595 600 605  
 Met Met Pro His Lys Ile Gly Asp Asp Ile Asn Val Lys Pro Asp Gly  
 610 615 620  
 Asn Trp Pro Asn Ala Asp Asp Pro Ser Asn Gly Gln Tyr Asn Trp Lys  
 625 630 635 640  
 Thr Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp Met Arg Tyr Glu Asn His  
 645 650 655  
 Gly Arg Glu Pro Met Val Thr Gln Arg Asn Ile His Ala Tyr Thr Leu  
 660 665 670  
 Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val Glu Asn Ala Asp Thr Leu  
 675 680 685  
 Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser Arg Gly Gly Tyr Ile Gly  
 690 695 700

Asn 705	Gln	His	Phe	Gly	Gly 710	Met	Trp	Val	Gly	Asp 715	Asn	Ser	Thr	Thr	Ser 720
Asn	Tyr	Ile	Gln	Met 725	Met	Ile	Ala	Asn	Asn 730	Ile	Asn	Met	Asn	Met 735	Ser
Cys	Leu	Pro	Leu 740	Val	Gly	Ser	Asp	Ile 745	Gly	Gly	Phe	Thr	Ser 750	Tyr	Asp
Asn	Glu	Asn 755	Gln	Arg	Thr	Pro	Cys 760	Thr	Gly	Asp	Leu	Met 765	Val	Arg	Tyr
Val 770	Gln	Ala	Gly	Cys	Leu	Leu 775	Pro	Trp	Phe	Arg	Asn 780	His	Tyr	Asp	Arg
Trp 785	Ile	Glu	Ser	Lys	Asp 790	His	Gly	Lys	Asp	Tyr 795	Gln	Glu	Leu	Tyr	Met 800
Tyr	Pro	Asn	Glu	Met 805	Asp	Thr	Leu	Arg	Lys	Phe 810	Val	Glu	Phe	Arg 815	Tyr
Arg	Trp	Gln 820	Glu	Val	Leu	Tyr	Thr	Ala 825	Met	Tyr	Gln	Asn	Ala 830	Ala	Phe
Gly	Lys	Pro 835	Ile	Ile	Lys	Ala	Ala 840	Ser	Met	Tyr	Asn	Asn 845	Asp	Ser	Asn
Val 850	Arg	Arg	Ala	Gln	Asn	Asp 855	His	Phe	Leu	Leu	Gly 860	Gly	His	Asp	Gly
Tyr 865	Arg	Ile	Leu	Cys	Ala 870	Pro	Val	Val	Trp	Glu 875	Asn	Ser	Thr	Glu	Arg 880
Glu	Leu	Tyr	Leu	Pro 885	Val	Leu	Thr	Gln	Trp 890	Tyr	Lys	Phe	Gly	Pro 895	Asp
Phe	Asp	Thr	Lys 900	Pro	Leu	Glu	Gly	Ala 905	Met	Asn	Gly	Gly	Asp 910	Arg	Ile
Tyr	Asn	Tyr 915	Pro	Val	Pro	Gln	Ser 920	Glu	Ser	Pro	Ile	Phe 925	Val	Arg	Glu
Gly	Ala 930	Ile	Leu	Pro	Thr	Arg 935	Tyr	Thr	Leu	Asn	Gly 940	Glu	Asn	Lys	Ser
Leu 945	Asn	Thr	Tyr	Thr	Asp 950	Glu	Asp	Pro	Leu	Val 955	Phe	Glu	Val	Phe	Pro 960
Leu	Gly	Asn	Asn	Arg 965	Ala	Asp	Gly	Met	Cys 970	Tyr	Leu	Asp	Asp	Gly 975	Gly
Val	Thr	Thr	Asn 980	Ala	Glu	Asp	Asn	Gly 985	Lys	Phe	Ser	Val	Val 990	Lys	Val
Ala	Ala	Glu 995	Gln	Asp	Gly	Gly	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Phe	Thr	Asn	Asp 1005

Cys Tyr Glu Tyr Val Phe Gly Gly Pro Phe Tyr Val Arg Val Arg Gly  
 1010 1015 1020  
 Ala Gln Ser Pro Ser Asn Ile His Val Ser Ser Gly Ala Gly Ser Gln  
 1025 1030 1035 1040  
 Asp Met Lys Val Ser Ser Ala Thr Ser Arg Ala Ala Leu Phe Asn Asp  
 1045 1050 1055  
 Gly Glu Asn Gly Asp Phe Trp Val Asp Gln Glu Thr Asp Ser Leu Trp  
 1060 1065 1070  
 Leu Lys Leu Pro Asn Val Val Leu Pro Asp Ala Val Ile Thr Ile Thr  
 1075 1080 1085

## (2)配列番号 2 の情報 :

## (i)配列の特色 :

(A)長さ : 1091 アミノ酸

(B)型 : アミノ酸

(D)トポロジー : 直鎖状

## (ii)配列の種類 : タンパク質

## (xi)配列 : 配列番号 2 :

Met Tyr Pro Thr Leu Thr Phe Val Ala Pro Ser Ala Leu Gly Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Phe Thr Cys Val Gly Ile Phe Arg Ser His Ile Leu Ile His Ser  
 20 25 30  
 Val Val Pro Ala Val Arg Leu Ala Val Arg Lys Ser Asn Arg Leu Asn  
 35 40 45  
 Val Ser Met Ser Ala Leu Phe Asp Lys Pro Thr Ala Val Thr Gly Gly  
 50 55 60  
 Lys Asp Asn Pro Asp Asn Ile Asn Tyr Thr Thr Tyr Asp Tyr Val Pro  
 65 70 75 80  
 Val Trp Arg Phe Asp Pro Leu Ser Asn Thr Asn Trp Phe Ala Ala Gly  
 85 90 95  
 Ser Ser Thr Pro Gly Asp Ile Asp Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val  
 100 105 110  
 Asn Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Phe Thr Leu Glu Lys Pro Val  
 115 120 125  
 Gln Val Gln Val Thr Ser Tyr Lys Asn Asn Cys Phe Arg Val Arg Phe  
 130 135 140

Asn Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Asp Arg Gly Pro Ile Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Gln Leu Asn Trp Ile Arg Lys Gln Glu Gln Ser Lys Gly Phe Asp  
 165 170 175  
 Pro Lys Met Gly Phe Thr Lys Glu Gly Phe Leu Lys Phe Glu Thr Lys  
 180 185 190  
 Asp Leu Asn Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg  
 195 200 205  
 Lys Arg Asp Gly Lys Gly Ile Met Glu Asn Asn Glu Val Pro Ala Gly  
 210 215 220  
 Ser Leu Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Ala Ile Ala Ser Val Asn Glu Asn Tyr Arg Asn Asp Pro Asp  
 245 250 255  
 Arg Lys Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Glu Phe Trp  
 260 265 270  
 Asp Ser Glu Gln Asn Arg Asn Lys Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile  
 275 280 285  
 Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Tyr Asn Tyr Asn Gln Ser Asp  
 290 295 300  
 Leu Ile Ala Pro Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Phe Tyr Ile Pro Met  
 305 310 315 320  
 Tyr Phe Ala Ala Pro Trp Val Val Val Lys Gly Cys Ser Gly Asn Ser  
 325 330 335  
 Asp Glu Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Thr  
 340 345 350  
 Tyr Met Asn Thr Gly Gly Thr Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Asn Leu  
 355 360 365  
 Ala Tyr Met Gly Ala Gln Cys Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr  
 370 375 380  
 Gly Asp Gly Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Gln Ala Phe Ser Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Gln Gly Lys Glu Phe Glu Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ala Val Met  
 405 410 415  
 Pro Pro Lys Tyr Val Phe Gly Tyr Phe Gln Gly Val Phe Gly Ile Ala  
 420 425 430  
 Ser Leu Leu Arg Glu Gln Arg Pro Glu Gly Gly Asn Asn Ile Ser Val  
 435 440 445

Gln Glu Ile Val Glu Gly Tyr Gln Ser Asn Asn Phe Pro Leu Glu Gly  
 450 455 460  
 Leu Ala Val Asp Val Asp Met Gln Gln Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr  
 465 470 475 480  
 Lys Ile Glu Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Thr Gly Gly Asp Ser  
 485 490 495  
 Asn Asn Lys Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys  
 500 505 510  
 Gln Thr Asn Val Thr Cys Phe Leu Arg Asn Asp Asn Gly Gly Ala Asp  
 515 520 525  
 Tyr Glu Val Asn Gln Thr Leu Arg Glu Lys Gly Leu Tyr Thr Lys Asn  
 530 535 540  
 Asp Ser Leu Thr Asn Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Asp Gly Pro Ser  
 545 550 555 560  
 Asp Ala Tyr Ile Gly His Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Gly Asn Cys Asp  
 565 570 575  
 Ala Leu Phe Pro Asp Trp Gly Arg Pro Gly Val Ala Glu Trp Trp Gly  
 580 585 590  
 Asp Asn Tyr Ser Lys Leu Phe Lys Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln  
 595 600 605  
 Asp Met Thr Val Pro Ala Met Met Pro His Lys Val Gly Asp Ala Val  
 610 615 620  
 Asp Thr Arg Ser Pro Tyr Gly Trp Pro Asn Glu Asn Asp Pro Ser Asn  
 625 630 635 640  
 Gly Arg Tyr Asn Trp Lys Ser Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp  
 645 650 655  
 Met Arg Tyr Glu Asn His Gly Arg Glu Pro Met Phe Thr Gln Arg Asn  
 660 665 670  
 Met His Ala Tyr Thr Leu Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val  
 675 680 685  
 Ala Asn Ala Asp Thr Leu Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser  
 690 695 700  
 Arg Gly Gly Tyr Ile Gly Asn Gln His Phe Gly Gly Met Trp Val Gly  
 705 710 715 720  
 Asp Asn Ser Ser Ser Gln Arg Tyr Leu Gln Met Met Ile Ala Asn Ile  
 725 730 735  
 Val Asn Met Asn Met Ser Cys Leu Pro Leu Val Gly Ser Asp Ile Gly  
 740 745 750

Gly Phe Thr Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Val Cys Pro Gly Asp Leu Met  
 755 760 765  
 Val Arg Phe Val Gln Ala Gly Cys Leu Leu Pro Trp Phe Arg Asn His  
 770 775 780  
 Tyr Gly Arg Leu Val Glu Gly Lys Gln Glu Gly Lys Tyr Tyr Gln Glu  
 785 790 795 800  
 Leu Tyr Met Tyr Lys Asp Glu Met Ala Thr Leu Arg Lys Phe Ile Glu  
 805 810 815  
 Phe Arg Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn  
 820 825 830  
 Ala Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn  
 835 840 845  
 Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly  
 850 855 860  
 His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr  
 865 870 875 880  
 Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe  
 885 890 895  
 Gly Pro Asp Tyr Asp Thr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Leu Asp Gly Gly  
 900 905 910  
 Gln Met Ile Lys Asn Tyr Ser Val Pro Gln Ser Asp Ser Pro Ile Phe  
 915 920 925  
 Val Arg Glu Gly Ala Ile Leu Pro Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Gly Ser  
 930 935 940  
 Asn Lys Ser Met Asn Thr Tyr Thr Asp Lys Asp Pro Leu Val Phe Glu  
 945 950 955 960  
 Val Phe Pro Leu Gly Asn Asn Arg Ala Asp Gly Met Cys Tyr Leu Asp  
 965 970 975  
 Asp Gly Gly Ile Thr Thr Asp Ala Glu Asp His Gly Lys Phe Ser Val  
 980 985 990  
 Ile Asn Val Glu Ala Leu Arg Lys Gly Val Thr Thr Thr Ile Lys Phe  
 995 1000 1005  
 Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Tyr Val Phe Asp Gly Pro Phe Tyr Val Arg  
 1010 1015 1020  
 Ile Arg Asn Leu Thr Thr Ala Ser Lys Ile Asn Val Ser Ser Gly Ala  
 1025 1030 1035 1040  
 Gly Glu Glu Asp Met Thr Pro Thr Ser Ala Asn Ser Arg Ala Ala Leu  
 1045 1050 1055

Phe Ser Asp Gly Gly Val Gly Glu Tyr Trp Ala Asp Asn Asp Thr Ser  
 1060 1065 1070

Ser Leu Trp Met Lys Leu Pro Asn Leu Val Leu Gln Asp Ala Val Ile  
 1075 1080 1085

Thr Ile Thr  
 1090

(2)配列番号 3 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 3267塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 二本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : DNA (genomic)

(xi)配列 : 配列番号 3 :

ATGTTTTCAA CCCTTGCGTT TGTCGCACCT AGTGCGCTGG GAGCCAGTAC CTTCGTAGGG	60
GCGGAGGTCA GGTCAAATGT TCGTATCCAT TCCGCTTTTC CAGCTGTGCA CACAGCTACT	120
CGCAAAACCA ATCGCCTCAA TGTATCCATG ACCGCATTGT CCGACAAACA AACGGCTACT	180
GCGGGTAGTA CAGACAATCC GGACGGTATC GACTACAAGA CCTACGATTA CGTCGGAGTA	240
TGGGGTTTCA GCCCCCTCTC CAACACGAAC TGGTTTGCTG CCGGCTCTTC TACCCCGGGT	300
GGCATCACTG ATTGGACGGC TACAATGAAT GTCAACTTCG ACCGTATCGA CAATCCGTCC	360
ATCACTGTCC AGCATCCCGT TCAGGTTTCA GTCACGTCAT ACAACAACAA CAGCTACAGG	420
GTTCGCTTCA ACCCTGATGG CCCTATTCTG GATGTGACTC GTGGGCCTAT CCTCAAGCAG	480
CAACTAGATT GGATTCTGAAC GCAGGAGCTG TCAGAGGGAT GTGATCCCGG AATGACTTTC	540
ACATCAGAAG GTTCTTGAC TTTTGAGACC AAGGATCTAA GCGTCATCAT CTACGGAAAT	600
TTCAAGACCA GAGTTACGAG AAAGTCTGAC GGCAAGGTCA TCATGGAAAA TGATGAAGTT	660
GGAACTGCAT CGTCCGGGAA CAAGTGCCGG GGATTGATGT TCGTTGATAG ATTATACGGT	720
AACGCTATCG CTTCGGTCAA CAAGAACTTC CGCAACGACG CGGTCAAGCA GGAGGGATTC	780
TATGGTGCA GGTGAAGTCAA CTGTAAGTAC CAGGACACCT ACATCTTAGA ACGCACTGGA	840
ATCGCCATGA CAAATTACAA CTACGATAAC TTGAACTATA ACCAGTGGGA CCTTAGACCT	900
CCGCATCATG ATGGTGCCCT CAACCCAGAC TATTATATTC CAATGTACTA CGCAGCACCT	960
TGGTTGATCG TTAATGGATG CGCCGGTACT TCGGAGCAGT ACTCGTATGG ATGGTTCATG	1020

GACAATGTCT CTCAATCTTA CATGAATACT GGAGATACTA CCTGGAATTC TGGACAAGAG	1080
GACCTGGCAT ACATGGGCGC GCAGTATGGA CCATTTGACC AACATTTTGT TTACGGTGCT	1140
GGGGGTGGGA TGGAAATGTGT GGTCACAGCG TTCTCTCTTC TACAAGGCAA GGAGTTCGAG	1200
AACCAAGTTC TCAACAAACG TTCAGTAATG CCTCCGAAAT ACGTCTTTGG TTTCTTCCAG	1260
GGTGTTTTCG GGACTTCTTC CTTGTTGAGA GCGCATATGC CAGCAGGTGA GAACAACATC	1320
TCAGTCGAAG AAATTGTAGA AGGTTATCAA AACAACAATT TCCCTTTCGA GGGGCTCGCT	1380
GTGGACGTGG ATATGCAAGA CAACTTGCGG GTGTTACCA CGAAGGGCGA ATTTTGGACC	1440
GCAAACAGGG TGGGTACTGG CGGGGATCCA AACAACCGAT CGGTTTTTGA ATGGGCACAT	1500
GACAAAGGCC TTGTTTGTCA GACAAATATA ACTTGCTTCC TGAGGAATGA TAACGAGGGG	1560
CAAGACTACG AGGTCAATCA GACGTTAAGG GAGAGGCAGT TGTACACGAA GAACGACTCC	1620
CTGACGGGTA CGGATTTTGG AATGACCGAC GACGGCCCCA GCGATGCGTA CATCGGTCAT	1680
CTGGACTATG GGGGTGGAGT AGAATGTGAT GCACTTTTCC CAGACTGGGG ACGGCCTGAC	1740
GTGGCCGAAT GGTGGGGAAA TAACTATAAG AAAGTGTCA GCATTGGTCT CGACTTCGTC	1800
TGGCAAGACA TGAAGTTCC AGCAATGATG CCGCACAAAA TTGGCGATGA CATCAATGTG	1860
AAACCGGATG GGAATTGGCC GAATGCGGAC GATCCGTCCA ATGGACAATA CAACTGGAAG	1920
ACGTACCATC CCCAAGTGCT TGTAAGTGAT ATGCGTTATG AGAATCATGG TCGGGAACCG	1980
ATGGTCACTC AACGCAACAT TCATGCGTAT ACAGTGTGCG AGTCTACTAG GAAGGAAGGG	2040
ATCGTGGAAG ACGCAGACAC TCTAACGAAG TTCCGCCGTA GCTACATTAT CAGTCGTGGT	2100
GGTTACATTG GTAACCAGCA TTTCGGGGGT ATGTGGGTGG GAGACAACCTC TACTACATCA	2160
AACTACATCC AAATGATGAT TGCCAACAAT ATTAACATGA ATATGTCTTG CTTGCCTCTC	2220
GTCGGCTCCG ACATTGGAGG ATTCACCTCA TACGACAATG AGAATCAGCG AACGCCGTGT	2280
ACCGGGGACT TGATGGTGAG GTATGTGCAG GCGGGCTGCC TGTTGCCGTG GTTCAGGAAC	2340
CACTATGATA GGTGGATCGA GTCCAAGGAC CACGGAAAGG ACTACCAGGA GCTGTACATG	2400
TATCCGAATG AAATGGATAC GTTGAGGAAG TTCGTTGAAT TCCGTTATCG CTGGCAGGAA	2460
GTGTTGTACA CGGCCATGTA CCAGAATGCG GCTTTCGGAA AGCCGATTAT CAAGGCTGCT	2520
TCGATGTACA ATAACGACTC AAACGTTGCG AGGGCGCAGA ACGATCATTT CTTCTTGGT	2580
GGACATGATG GATATCGCAT TCTGTGCGCG CCTGTTGTGT GGGAGAATTC GACCGAACGC	2640
GAATTGTACT TGCCCGTGCT GACCCAATGG TACAAATTCG GTCCCGACTT TGACACCAAG	2700

CCTCTGGAAG GAGCGATGAA CGGAGGGGAC CGAATTTACA ACTACCCTGT ACCGCAAAGT	2760
GAATCACCAA TCTTCGTGAG AGAAGGTGCG ATTCTCCCTA CCCGCTACAC GTTGAACGGT	2820
GAAAACAAAT CATTGAACAC GTACACGGAC GAAGATCCGT TGGTGTTTGA AGTATTCCCC	2880
CTCGGAAACA ACCGTGCCGA CGGTATGTGT TATCTTGATG ATGGCGGTGT GACCACCAAT	2940
GCTGAAGACA ATGGCAAGTT CTCTGTCGTC AAGGTGGCAG CGGAGCAGGA TGGTGGTACG	3000
GAGACGATAA CGTTTACGAA TGATTGCTAT GAGTACGTTT TCGGTGGACC GTTCTACGTT	3060
CGAGTGCGCG GCGCTCAGTC GCCGTCGAAC ATCCACGTGT CTTCTGGAGC GGGTTCTCAG	3120
GACATGAAGG TGAGCTCTGC CACTTCCAGG GCTGCGCTGT TCAATGACGG GGAGAACGGT	3180
GATTTCTGGG TTGACCA6GA GACAGATTCT CTGTGGCTGA AGTTGCCCAA CGTTGTTCTC	3240
CCGGACGCTG TGATCACAAT TACCTAA	3267

## (2)配列番号 4 の情報 :

## (i)配列の特色 :

- (A)長さ : 3276塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 二本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

## (ii)配列の種類 : DNA (genomic)

## (xi)配列 : 配列番号 4 :

ATGTATCCAA CCCTCACCTT CGTGGCGCCT AGTGCCTAG GGGCCAGAAC TTTCACGTGT	60
GTGGGCATTT TTAGGTCACA CATTCTTATT CATTCCGTTG TTCCAGCGGT GCGTCTAGCT	120
GTGCGCAAAA GCAACCGCCT CAATGTATCC ATGTCCGCTT TGTTGACAA ACCGACTGCT	180
GTTACTGGAG GGAAGGACAA CCCGGACAAT ATCAATTACA CCACTTATGA CTACGTCCCT	240
GTGTGGCGCT TCGACCCCT CAGCAATACG AACTGGTTTG CTGCCGGATC TTCCACTCCC	300
GGCGATATTG ACGACTGGAC GGC6ACAATG AATGTGAACT TCGACCGTAT CGACAATCCA	360
TCCTTCACTC TCGAGAAACC GGTTCAGGTT CAGGTCACGT CATACAAGAA CAATTGTTTC	420
AGGGTTCGCT TCAACCCCTGA TGGTCCTATT CGCGATGTGG ATCGTGGGCC TATCCTCCAG	480
CAGCAACTAA ATTGGATCCG GAAGCAGGAG CAGTCGAAGG GGTTCGATCC TAAGATGGGC	540
TTCACAAAAG AAGGTTTCTT GAAATTTGAG ACCAAGGATC TGAACGTTAT CATATATGGC	600
AATTTTAAGA CTAGAGTTAC GAGGAAGAGG GATGGAAAAG GGATCATGGA GAATAATGAA	660

GTGCCGGCAG GATCGTTAGG GAACAAGTGC CGGGGATTGA TGTTTGTGCA CAGGTTGTAC	720
GGCACTGCCA TCGCTTCCGT TAATGAAAAT TACCGCAACG ATCCCGACAG GAAAGAGGGG	780
TTCTATGGTG CAGGAGAAGT AACTGCGAG TTTTGGGACT CCGAACAAAA CAGGAACAAG	840
TACATCTTAG AACGAAGTGG AATCGCCATG ACAAATTACA ATTATGACAA CTATAACTAC	900
AACCAGTCAG ATCTTATTGC TCCAGGATAT CCTTCCGACC CGAACTTCTA CATTCCCATG	960
TATTTTGCAG CACCTTGGGT AGTTGTTAAG GGATGCAGTG GCAACAGCGA TGAACAGTAC	1020
TCGTACGGAT GGTTCATGGA TAATGTCTCC CAACTTACA TGAATACTGG TGGTACTTCC	1080
TGGAAGTGTG GAGAGGAGAA CTTGGCATAC ATGGGAGCAC AGTGCGGTCC ATTTGACCAA	1140
CATTTTGTGT ATGGTGATGG AGATGGTCTT GAGGATGTTG TCCAAGCGTT CTCTCTTCTG	1200
CAAGGCAAAG AGTTTGAGAA CCAAGTTCTG AACAAACGTG CCGTAATGCC TCCGAAATAT	1260
GTGTTTGGTT ACTTTCAGGG AGTCTTTGGG ATTGCTTCTT TGTTGAGAGA GCAAAGACCA	1320
GAGGGTGGTA ATAACATCTC TGTTCAGAG ATTGTGGAAG GTTACCAAAG CAATAACTTC	1380
CCTTTAGACG GGTAGCCGT AGATGTGGAT ATGCAACAAG ATTTGCGCGT GTTCACCACG	1440
AAGATTGAAT TTTGGACGGC AAATAAGGTA GGCACCGGGG GAGACTCGAA TAACAAGTCG	1500
GTGTTTGAAT GGGCACATGA CAAAGGCCTT GTATGTCAGA CGAATGTTAC TTGCTTCTTG	1560
AGAAACGACA ACGGCGGGGC AGATTACGAA GTCAATCAGA CATTGAGGGA GAAGGGTTTG	1620
TACACGAAGA ATGACTCACT GACGAACACT AACTTCGGAA CTACCAACGA CGGGCCGAGC	1680
GATGCGTACA TTGGACATCT GGAATATGGT GCGGGAGGGA ATTGTGATGC ACTTTTCCCA	1740
GACTGGGGTC GACCGGGTGT GGCTGAATGG TGGGGTGATA ACTACAGCAA GCTCTTCAA	1800
ATTGGTCTGG ATTTCTGTCTG GCAAGACATG ACAGTTCAG CTATGATGCC ACACAAAGTT	1860
GGCGACGCAG TCGATACGAG ATCACCCTTAC GGCTGGCCGA ATGAGAATGA TCCTTCGAAC	1920
GGACGATACA ATTGGAAATC TTACCATCCA CAAGTTCTCG TAACTGATAT GCGATATGAG	1980
AATCATGGAA GGGAAACCGAT GTTCACTCAA CGCAATATGC ATGCGTACAC ACTCTGTGAA	2040
TCTACGAGGA AGGAAGGGAT TGTTGCAAAT GCAGACACTC TAACGAAGTT CCGCCGCAGT	2100
TATATTATCA GTCGTGGAGG TTACATTGGC AACCAGCATT TTGGAGGAAT GTGGGTGGA	2160
GACAACTCTT CCTCCCAAAG ATACCTCCAA ATGATGATCG CGAACATCGT CAACATGAAC	2220
ATGTCTTGCC TTCCACTAGT TGGGTCCGAC ATTGGAGGTT TTAATTCGTA TGATGGACGA	2280
AACGTGTGTC CCGGGGATCT AATGGTAAGA TTCGTGCAGG CGGGTTGCTT ACTACCGTGG	2340

TTCAGAAACC ACTATGGTAG GTTGGTCGAG GGCAAGCAAG AGGGAAAATA CTATCAAGAA	2400
CTGTACATGT ACAAGGACGA GATGGCTACA TTGAGAAAAT TCATTGAATT CCGTTACCGC	2460
TGGCAGGAGG TGTGTACAC TGCTATGTAC CAGAATGCGG CTTTCGGGAA ACCGATTATC	2520
AAGGCAGCTT CCATGTACGA CAACGACAGA AACGTTGCGG GCGCACAGGA TGACCACTTC	2580
CTTCTCGGCG GACACGATGG ATATCGTATT TTGTGTGCAC CTGTTGTGTG GGAGAATACA	2640
ACCAGTCGCG ATCTGTACTT GCCTGTGCTG ACCAAATGGT ACAAATTCGG CCCTGACTAT	2700
GACACCAAGC GCCTGGATTG TCGTTGGAT GGAGGGCAGA TGATTAAGAA CTATTCTGTG	2760
CCACAAAGCG ACTCTCCGAT ATTTGTGAGG GAAGGAGCTA TTCTCCCTAC CCGCTACACG	2820
TTGGACGGTT CGAACAAGTC AATGAACACG TACACAGACA AAGACCCGTT GGTGTTTGAG	2880
GTATTCCCTC TTGGAAACAA CCGTGCCGAC GGTATGTGTT ATCTTGATGA TGGCGGTATT	2940
ACTACAGATG CTGAGGACCA TGGCAAATTC TCTGTTATCA ATGTCGAAGC CTTACGGAAA	3000
GGTGTTACGA CGACGATCAA GTTTGCGTAT GACACTTATC AATACGTATT TGATGGTCCA	3060
TTCTACGTTT GAATCCGTAA TCTTACGACT GCATCAAAAA TTAACGTGTC TTCTGGAGCG	3120
GGTGAAGAGG ACATGACACC GACCTCTGCG AACTCGAGGG CAGCTTTGTT CAGTGATGGA	3180
GGTGTTGGAG AATACTGGGC TGACAATGAT ACGTCTTCTC TGTGGATGAA GTTGCCAAAC	3240
CTGGTTCTGC AAGACGCTGT GATTACCATT ACGTAG	3276

## (2)配列番号5の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 1066アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: タンパク質

## (xi)配列: 配列番号5:

Met	Ala	Gly	Phe	Ser	Asp	Pro	Leu	Asn	Phe	Cys	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Val	Ala	Leu	Asp	Trp	Lys	Gly	Pro	Gln	Lys	Ile	Ile	Gly	Val
		20						25					30		
Asp	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Thr	Lys	Phe	Pro	Lys	Asn	Trp	His	Gly
	35						40					45			
Val	Asn	Leu	Arg	Phe	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Val	Gln	Phe	Ile
	50					55					60				

Arg Pro Cys Val Trp Arg Val Arg Tyr Asp Pro Gly Phe Lys Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Arg Thr Ile Val Gln Asp Tyr Met  
 85 90 95  
 Ser Thr Leu Ser Asn Lys Leu Asp Thr Tyr Arg Gly Leu Thr Trp Glu  
 100 105 110  
 Thr Lys Cys Glu Asp Ser Gly Asp Phe Phe Thr Phe Ser Ser Lys Val  
 115 120 125  
 Thr Ala Val Glu Lys Ser Glu Arg Thr Arg Asn Lys Val Gly Asp Gly  
 130 135 140  
 Leu Arg Ile His Leu Trp Lys Ser Pro Phe Arg Ile Gln Val Val Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Thr Pro Leu Lys Asp Pro Tyr Pro Ile Pro Asn Val Ala Ala  
 165 170 175  
 Ala Glu Ala Arg Val Ser Asp Lys Val Val Trp Gln Thr Ser Pro Lys  
 180 185 190  
 Thr Phe Arg Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr  
 195 200 205  
 Val Leu Asp Ile Val Lys Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly  
 210 215 220  
 Glu Met Gly Gly Ile Gln Phe Met Lys Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr Ala Gln Gly Ala  
 245 250 255  
 Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr Leu Asp  
 260 265 270  
 Val Asn Ser Asn Pro Glu His Lys Asn Ile Thr Ala Thr Phe Ile Asp  
 275 280 285  
 Asn Tyr Ser Gln Ile Ala Ile Asp Phe Gly Lys Thr Asn Ser Gly Tyr  
 290 295 300  
 Ile Lys Leu Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ile Asp Cys Tyr Gly Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Asp Thr Val Pro Glu Ile Val Arg Leu Tyr Thr Gly Leu Val Gly  
 325 330 335  
 Arg Ser Lys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile Leu Gly Ala His Gln Ala Cys  
 340 345 350  
 Tyr Gly Tyr Gln Gln Glu Ser Asp Leu Tyr Ser Val Val Gln Gln Tyr  
 355 360 365

Arg Asp Cys Lys Phe Pro Leu Asp Gly Ile His Val Asp Val Asp Val  
 370 375 380  
 Gln Asp Gly Phe Arg Thr Phe Thr Thr Asn Pro His Thr Phe Pro Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Lys Glu Met Phe Thr Asn Leu Arg Asn Asn Gly Ile Lys Cys Ser  
 405 410 415  
 Thr Asn Ile Thr Pro Val Ile Ser Ile Asn Asn Arg Glu Gly Gly Tyr  
 420 425 430  
 Ser Thr Leu Leu Glu Gly Val Asp Lys Lys Tyr Phe Ile Met Asp Asp  
 435 440 445  
 Arg Tyr Thr Glu Gly Thr Ser Gly Asn Ala Lys Asp Val Arg Tyr Met  
 450 455 460  
 Tyr Tyr Gly Gly Gly Asn Lys Val Glu Val Asp Pro Asn Asp Val Asn  
 465 470 475 480  
 Gly Arg Pro Asp Phe Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Pro Ala Asn Phe Asn  
 485 490 495  
 Ser Lys Gln Tyr Pro Tyr His Gly Gly Val Ser Tyr Gly Tyr Gly Asn  
 500 505 510  
 Gly Ser Ala Gly Phe Tyr Pro Asp Leu Asn Arg Lys Glu Val Arg Ile  
 515 520 525  
 Trp Trp Gly Met Gln Tyr Lys Tyr Leu Phe Asp Met Gly Leu Glu Phe  
 530 535 540  
 Val Trp Gln Asp Met Thr Thr Pro Ala Ile His Thr Ser Tyr Gly Asp  
 545 550 555 560  
 Met Lys Gly Leu Pro Thr Arg Leu Leu Val Thr Ser Asp Ser Val Thr  
 565 570 575  
 Asn Ala Ser Glu Lys Lys Leu Ala Ile Glu Thr Trp Ala Leu Tyr Ser  
 580 585 590  
 Tyr Asn Leu His Lys Ala Thr Trp His Gly Leu Ser Arg Leu Glu Ser  
 595 600 605  
 Arg Lys Asn Lys Arg Asn Phe Ile Leu Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Gly  
 610 615 620  
 Ala Tyr Arg Phe Ala Gly Leu Trp Thr Gly Asp Asn Ala Ser Asn Trp  
 625 630 635 640  
 Glu Phe Trp Lys Ile Ser Val Ser Gln Val Leu Ser Leu Gly Leu Asn  
 645 650 655  
 Gly Val Cys Ile Ala Gly Ser Asp Thr Gly Gly Phe Glu Pro Tyr Arg  
 660 665 670

Asp Ala Asn Gly Val Glu Glu Lys Tyr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Ile  
 675 680 685  
 Arg Trp Tyr Thr Gly Ser Phe Leu Leu Pro Trp Leu Arg Asn His Tyr  
 690 695 700  
 Val Lys Lys Asp Arg Lys Trp Phe Gln Glu Pro Tyr Ser Tyr Pro Lys  
 705 710 715 720  
 His Leu Glu Thr His Pro Glu Leu Ala Asp Gln Ala Trp Leu Tyr Lys  
 725 730 735  
 Ser Val Leu Glu Ile Cys Arg Tyr Tyr Val Glu Leu Arg Tyr Ser Leu  
 740 745 750  
 Ile Gln Leu Leu Tyr Asp Cys Met Phe Gln Asn Val Val Asp Gly Met  
 755 760 765  
 Pro Ile Thr Arg Ser Met Leu Leu Thr Asp Thr Glu Asp Thr Thr Phe  
 770 775 780  
 Phe Asn Glu Ser Gln Lys Phe Leu Asp Asn Gln Tyr Met Ala Gly Asp  
 785 790 795 800  
 Asp Ile Leu Val Ala Pro Ile Leu His Ser Arg Lys Glu Ile Pro Gly  
 805 810 815  
 Glu Asn Arg Asp Val Tyr Leu Pro Leu Tyr His Thr Trp Tyr Pro Ser  
 820 825 830  
 Asn Leu Arg Pro Trp Asp Asp Gln Gly Val Ala Leu Gly Asn Pro Val  
 835 840 845  
 Glu Gly Gly Ser Val Ile Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Val Ala Pro Glu  
 850 855 860  
 Asp Tyr Asn Leu Phe His Ser Val Val Pro Val Tyr Val Arg Glu Gly  
 865 870 875 880  
 Ala Ile Ile Pro Gln Ile Glu Val Arg Gln Trp Thr Gly Gln Gly Gly  
 885 890 895  
 Ala Asn Arg Ile Lys Phe Asn Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Lys Glu Tyr  
 900 905 910  
 Cys Thr Tyr Leu Asp Asp Gly Val Ser Arg Asp Ser Ala Pro Glu Asp  
 915 920 925  
 Leu Pro Gln Tyr Lys Glu Thr His Glu Gln Ser Lys Val Glu Gly Ala  
 930 935 940  
 Glu Ile Ala Lys Gln Ile Gly Lys Lys Thr Gly Tyr Asn Ile Ser Gly  
 945 950 955 960  
 Thr Asp Pro Glu Ala Lys Gly Tyr His Arg Lys Val Ala Val Thr Gln  
 965 970 975

Thr Ser Lys Asp Lys Thr Arg Thr Val Thr Ile Glu Pro Lys His Asn  
 980 985 990  
 Gly Tyr Asp Pro Ser Lys Glu Val Gly Asp Tyr Tyr Thr Ile Ile Leu  
 995 1000 1005  
 Trp Tyr Ala Pro Gly Phe Asp Gly Ser Ile Val Asp Val Ser Lys Thr  
 1010 1015 1020  
 Thr Val Asn Val Glu Gly Gly Val Glu His Gln Val Tyr Lys Asn Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Asp Leu His Thr Val Val Ile Asp Val Lys Glu Val Ile Gly Thr Thr  
 1045 1050 1055  
 Lys Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Ala Ala  
 1060 1065

## (2)配列番号6の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ: 1070アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: タンパク質

## (xi)配列: 配列番号6:

Met Ala Gly Leu Ser Asp Pro Leu Asn Phe Cys Lys Ala Glu Asp Tyr  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Ala Ala Lys Gly Trp Ser Gly Pro Gln Lys Ile Ile Arg Tyr  
 20 25 30  
 Asp Gln Thr Pro Pro Gln Gly Thr Lys Asp Pro Lys Ser Trp His Ala  
 35 40 45  
 Val Asn Leu Pro Phe Asp Asp Gly Thr Met Cys Val Val Gln Phe Val  
 50 55 60  
 Arg Pro Cys Val Trp Arg Val Arg Tyr Asp Pro Ser Val Lys Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Arg Thr Ile Val Gln Asp Tyr Met  
 85 90 95  
 Thr Thr Leu Val Gly Asn Leu Asp Ile Phe Arg Gly Leu Thr Trp Val  
 100 105 110  
 Ser Thr Leu Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Tyr Thr Phe Lys Ser Glu Val  
 115 120 125

Thr Ala Val Asp Glu Thr Glu Arg Thr Arg Asn Lys Val Gly Asp Gly  
 130 135 140  
 Leu Lys Ile Tyr Leu Trp Lys Asn Pro Phe Arg Ile Gln Val Val Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Thr Pro Leu Val Asp Pro Phe Pro Ile Pro Asn Val Ala Asn  
 165 170 175  
 Ala Thr Ala Arg Val Ala Asp Lys Val Val Trp Gln Thr Ser Pro Lys  
 180 185 190  
 Thr Phe Arg Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr  
 195 200 205  
 Val Leu Asp Ile Ile Lys Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly  
 210 215 220  
 Glu Met Gly Gly Ile Glu Phe Met Lys Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr Ala Gln Gly Ala  
 245 250 255  
 Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr Leu Asp  
 260 265 270  
 Val Asn Ser Asn Pro Glu His Lys Asn Ile Thr Ala Thr Phe Ile Asp  
 275 280 285  
 Asn Tyr Ser Gln Ile Ala Ile Asp Phe Gly Lys Thr Asn Ser Gly Tyr  
 290 295 300  
 Ile Lys Leu Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ile Asp Cys Tyr Gly Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Asp Thr Val Pro Glu Ile Val Arg Leu Tyr Thr Gly Leu Val Gly  
 325 330 335  
 Arg Ser Lys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile Leu Gly Ala His Gln Ala Cys  
 340 345 350  
 Tyr Gly Tyr Gln Gln Glu Ser Asp Leu His Ala Val Val Gln Gln Tyr  
 355 360 365  
 Arg Asp Thr Lys Phe Pro Leu Asp Gly Leu His Val Asp Val Asp Phe  
 370 375 380  
 Gln Asp Asn Phe Arg Thr Phe Thr Thr Asn Pro Ile Thr Phe Pro Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Lys Glu Met Phe Thr Asn Leu Arg Asn Asn Gly Ile Lys Cys Ser  
 405 410 415  
 Thr Asn Ile Thr Pro Val Ile Ser Ile Arg Asp Arg Pro Asn Gly Tyr  
 420 425 430

Ser Thr Leu Asn Glu Gly Tyr Asp Lys Lys Tyr Phe Ile Met Asp Asp  
 435 440 445  
 Arg Tyr Thr Glu Gly Thr Ser Gly Asp Pro Gln Asn Val Arg Tyr Ser  
 450 455 460  
 Phe Tyr Gly Gly Gly Asn Pro Val Glu Val Asn Pro Asn Asp Val Trp  
 465 470 475 480  
 Ala Arg Pro Asp Phe Gly Asp Asn Tyr Asp Phe Pro Thr Asn Phe Asn  
 485 490 495  
 Cys Lys Asp Tyr Pro Tyr His Gly Gly Val Ser Tyr Gly Tyr Gly Asn  
 500 505 510  
 Gly Thr Pro Gly Tyr Tyr Pro Asp Leu Asn Arg Glu Glu Val Arg Ile  
 515 520 525  
 Trp Trp Gly Leu Gln Tyr Glu Tyr Leu Phe Asn Met Gly Leu Glu Phe  
 530 535 540  
 Val Trp Gln Asp Met Thr Thr Pro Ala Ile His Ser Ser Tyr Gly Asp  
 545 550 555 560  
 Met Lys Gly Leu Pro Thr Arg Leu Leu Val Thr Ala Asp Ser Val Thr  
 565 570 575  
 Asn Ala Ser Glu Lys Lys Leu Ala Ile Glu Ser Trp Ala Leu Tyr Ser  
 580 585 590  
 Tyr Asn Leu His Lys Ala Thr Phe His Gly Leu Gly Arg Leu Glu Ser  
 595 600 605  
 Arg Lys Asn Lys Arg Asn Phe Ile Leu Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Gly  
 610 615 620  
 Ala Tyr Arg Phe Ala Gly Leu Trp Thr Gly Asp Asn Ala Ser Thr Trp  
 625 630 635 640  
 Glu Phe Trp Lys Ile Ser Val Ser Gln Val Leu Ser Leu Gly Leu Asn  
 645 650 655  
 Gly Val Cys Ile Ala Gly Ser Asp Thr Gly Gly Phe Glu Pro Ala Arg  
 660 665 670  
 Thr Glu Ile Gly Glu Glu Lys Tyr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Ile Arg  
 675 680 685  
 Trp Tyr Thr Gly Ser Phe Leu Leu Pro Trp Leu Arg Asn His Tyr Val  
 690 695 700  
 Lys Lys Asp Arg Lys Trp Phe Gln Glu Pro Tyr Ala Tyr Pro Lys His  
 705 710 715 720  
 Leu Glu Thr His Pro Glu Leu Ala Asp Gln Ala Trp Leu Tyr Lys Ser  
 725 730 735

Val Leu Glu Ile Cys Arg Tyr Trp Val Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Ile  
 740 745 750  
 Gln Leu Leu Tyr Asp Cys Met Phe Gln Asn Val Val Asp Gly Met Pro  
 755 760 765  
 Leu Ala Arg Ser Met Leu Leu Thr Asp Thr Glu Asp Thr Thr Phe Phe  
 770 775 780  
 Asn Glu Ser Gln Lys Phe Leu Asp Asn Gln Tyr Met Ala Gly Asp Asp  
 785 790 795 800  
 Ile Leu Val Ala Pro Ile Leu His Ser Arg Asn Glu Val Pro Gly Glu  
 805 810 815  
 Asn Arg Asp Val Tyr Leu Pro Leu Phe His Thr Trp Tyr Pro Ser Asn  
 820 825 830  
 Leu Arg Pro Trp Asp Asp Gln Gly Val Ala Leu Gly Asn Pro Val Glu  
 835 840 845  
 Gly Gly Ser Val Ile Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Val Ala Pro Glu Asp  
 850 855 860  
 Tyr Asn Leu Phe His Asn Val Val Pro Val Tyr Ile Arg Glu Gly Ala  
 865 870 875 880  
 Ile Ile Pro Gln Ile Gln Val Arg Gln Trp Ile Gly Glu Gly Gly Pro  
 885 890 895  
 Asn Pro Ile Lys Phe Asn Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Lys Glu Tyr Val  
 900 905 910  
 Thr Tyr Leu Asp Asp Gly Val Ser Arg Asp Ser Ala Pro Asp Asp Leu  
 915 920 925  
 Pro Gln Tyr Arg Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Lys Val Glu Gly Lys Asp  
 930 935 940  
 Val Gln Lys Gln Leu Ala Val Ile Gln Gly Asn Lys Thr Asn Asp Phe  
 945 950 955 960  
 Ser Ala Ser Gly Ile Asp Lys Glu Ala Lys Gly Tyr His Arg Lys Val  
 965 970 975  
 Ser Ile Lys Gln Glu Ser Lys Asp Lys Thr Arg Thr Val Thr Ile Glu  
 980 985 990  
 Pro Lys His Asn Gly Tyr Asp Pro Ser Lys Glu Val Gly Asn Tyr Tyr  
 995 1000 1005  
 Thr Ile Ile Leu Trp Tyr Ala Pro Gly Phe Asp Gly Ser Ile Val Asp  
 1010 1015 1020

Val Ser Gln Ala Thr Val Asn Ile Glu Gly Gly Val Glu Cys Glu Ile  
 1025 1030 1035 1040  
 Phe Lys Asn Thr Gly Leu His Thr Val Val Val Asn Val Lys Glu Val  
 1045 1050 1055  
 Ile Gly Thr Thr Lys Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Thr Ala  
 1060 1065 1070

## (2)配列番号7の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 3201塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 二本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (xi)配列: 配列番号7:

ATGGCAGGAT TTTCTGATCC TCTCAACTTT TGCAAAGCAG AAGACTACTA CAGTGTTCGG	60
CTAGACTGGA AGGGCCCTCA AAAAATCATT GGAGTAGACA CTACTCCTCC AAAGAGCACC	120
AAGTTCCCCA AAAACTGGCA TGGAGTGAAC TTGAGATTCG ATGATGGGAC TTTAGGTGTG	180
GTTCAAGTTCA TTAGGCCGTG CGTTTGGAGG GTTAGATACG ACCCTGGTTT CAAGACCTCT	240
GACGAGTATG GTGATGAGAA TACGAGGACA ATTGTGCAAG ATTATATGAG TACTCTGAGT	300
AATAAATTGG ATACTTATAG AGGTCTTACG TGGGAAACCA AGTGTGAGGA TTCGGGAGAT	360
TTCTTTACCT TCTCATCCAA GGTCAACGCC GTTGAAAAAT CCGAGCGGAC CCGCAACAAG	420
GTCGGCGATG GCCTCAGAAT TCACCTATGG AAAAGCCCTT TCCGCATCCA AGTAGTGCGC	480
ACCTTGACCC CTTTGAAGGA TCCTTACCCC ATTCCAAATG TAGCCGCAGC CGAAGCCCGT	540
GTGTCCGACA AGGTGCTTTG GCAAACGTCT CCCAAGACAT TCAGAAAGAA CCTGCATCCG	600
CAACACAAGA TGCTAAAGGA TACAGTTCTT GACATTGTCA AACCTGGACA TGGCGAGTAT	660
GTGGGGTGGG GAGAGATGGG AGGTATCCAG TTTATGAAGG AGCCAACATT CATGAACTAT	720
TTTAACTTCG ACAATATGCA ATACCAGCAA GTCTATGCCC AAGGTGCTCT CGATTCTCGC	780
GAGCCACTGT ACCACTCGGA TCCCTTCTAT CTTGATGTGA ACTCCAACCC GGAGCACAAG	840
AATATCACGG CAACCTTTAT CGATAACTAC TCTCAAATTG CCATCGACTT TGGAAAGACC	900
AACTCAGGCT ACATCAAGCT GGGAAACCAGG TATGGTGGTA TCGATTGTTA CGGTATCAGT	960
GCGGATACGG TCCCGGAAAT TGTACGACTT TATACAGGTC TTGTTGGACG TTCAAAGTTG	1020

AAGCCCAGAT ATATTCTCGG GGCCCATCAA GCCTGTTATG GATACCAACA GGAAAGTGAC	1080
TTGTATTCTG TGGTCCAGCA GTACGGTGAC TGTAATTTTC CACTTGACGG GATTACAGTC	1140
GATGTCGATG TTCAGGACGG CTTCAGAACT TTCACCACCA ACCCACACAC TTTCCCTAAC	1200
CCCAAAGAGA TGTTTACTAA CTTGAGGAAT AATGGAATCA AGTGCTCCAC CAATATCACT	1260
CCTGTTATCA GCATTAACAA CAGAGAGGGT GGATACAGTA CCCTCCTTGA GGGAGTTGAC	1320
AAAAAATACT TTATCATGGA CGACAGATAT ACCGAGGGAA CAAGTGGGAA TGCGAAGGAT	1380
GTTCGGTACA TGTAACACGG TGGTGGTAAT AAGGTTGAGG TCGATCCTAA TGATGTTAAT	1440
GGTCGGCCAG ACTTTAAAGA CAACTATGAC TTCCCCGCGA ACTTCAACAG CAAACAATAC	1500
CCCTATCATG GTGGTGTGAG CTACGGTTAT GGGAACGGTA GTGCAGGTTT TTACCCGGAC	1560
CTCAACAGAA AGGAGGTTCTG TATCTGGTGG GGAATGCAGT ACAAGTATCT CTTGATATG	1620
GGACTGGAAT TTGTGTGGCA AGACATGACT ACCCCAGCAA TCCACACATC ATATGGAGAC	1680
ATGAAAGGGT TGCCACCCCG TCTACTCGTC ACCTCAGACT CCGTCACCAA TGCCTCTGAG	1740
AAAAAGCTCG CAATTGAAAC TTGGGCTCTC TACTCCTACA ATCTCCACAA AGCAACTTGG	1800
CATGGTCTTA GTCGTCTCGA ATCTCGTAAG AACAAACGAA ACTTCATCCT CGGGCGTGGA	1860
AGTTATGCCG GAGCCTATCG TTTTGCTGGT CTCTGGACTG GGGATAATGC AAGTAACTGG	1920
GAATTCTGGA AGATATCGGT CTCTCAAGTT CTTTCTCTGG GCCTCAATGG TGTGTGCATC	1980
GCGGGGTCTG ATACGGGTGG TTTTGAACCC TACCGTGATG CAAATGGGGT CGAGGAGAAA	2040
TACTGTAGCC CAGAGCTACT CATCAGGTGG TATACTGGTT CATTCCTCTT GCCGTGGCTC	2100
AGGAACCATT ATGTCAAAAA GGACAGGAAA TGGTTCAGG AACCATATC GTACCCCAAG	2160
CATCTTGAAA CCCATCCAGA ACTCGCAGAC CAAGCATEGC TCTATAAATC CGTTTTGGAG	2220
ATCTGTAGGT ACTATGTGGA GCTTAGATAC TCCCTCATCC AACTACTTTA CGACTGCATG	2280
TTTCAAAACG TAGTCGACGG TATGCCAATC ACCAGATCTA TGCTCTTGAC CGATACTGAG	2340
GATACCACCT TCTTCAACGA GAGCCAAAAG TTCCTCGACA ACCAATATAT GGCTGGTGAC	2400
GACATTCTTG TTGCACCCAT CCTCCACAGT CGCAAAGAAA TTCCAGGCGA AAACAGAGAT	2460
GTCTATCTCC CTCTTTACCA CACCTGGTAC CCCTCAAATT TGAGACCATG GGACGATCAA	2520
GGAGTCGCTT TGGGGAATCC TGTCGAAGGT GGTAGTGTCA TCAATTATAC TGCTAGGATT	2580
GTTGCACCCG AGGATTATAA TCTCTTCAC AGCGTGGTAC CAGTCTACGT TAGAGAGGGT	2640
GCCATCATCC CGCAAATCGA AGTACGCCAA TGGACTGGCC AGGGGGGAGC CAACCGCATC	2700

AAGTTCAACA TCTACCCTGG AAAGGATAAG GAGTACTGTA CCTATCTTGA TGATGGTGTT	2760
AGCCGTGATA GTGCGCCGGA AGACCTCCCA CAGTACAAAG AGACCCACGA ACAGTCGAAG	2820
GTTGAAGGCG CGGAAATCGC AAAGCAGATT GGAAAGAAGA CGGGTTACAA CATCTCAGGA	2880
ACCGACCCAG AAGCAAAGGG TTATCACC GC AAAGTTGCTG TCACACAAAC GTCAAAAGAC	2940
AAGACGCGTA CTGTCACTAT TGAGCCAAAA CACAATGGAT ACGACCCTTC CAAAGAGGTG	3000
GGTGATTATT ATACCATCAT TCTTTGGTAC GCACCAGGTT TCGATGGCAG CATCGTCGAT	3060
GTGAGCAAGA CGACTGTGAA TGTGAGGGT GGGGTGGAGC ACCAAGTTTA TAAGAACTCG	3120
GATTACATA CGGTTGTTAT CGACGTGAAG GAGGTGATCG GTACCACAAA GAGCGTCAAG	3180
ATCACATGTA CTGCCGCTTA A	3201

## (2)配列番号8の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ: 3213塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 二本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (xi)配列: 配列番号8:

ATGGCAGGAT TATCCGACCC TCTCAATTTT TGCAAAGCAG AGGACTACTA CGCTGCTGCC	60
AAAGGCTGGA GTGGCCCTCA GAAGATCATT CGCTATGACC AGACCCCTCC TCAGGGTACA	120
AAAGATCCGA AAAGCTGGCA TCGGTAAAC CTTCCTTTTCG ATGACGGGAC TATGTGTGTA	180
GTGCAATTCG TCAGACCCTG TGTGTTGGAGG GTTAGATATG ACCCCAGTGT CAAGACTTCT	240
GATGAGTACG GCGATGAGAA TACGAGGACT ATTGTACAAG ACTACATGAC TACTCTGGTT	300
GGAAACTTGG ACATTTTTCAG AGGTCTTACG TGGGTTTCTA CGTTGGAGGA TTCGGGCGAG	360
TACTACACCT TCAAGTCCGA AGTCACTGCC GTGGACGAAA CCGAACGGAC TCGAAACAAG	420
GTCGGCGACG GCCTCAAGAT TTACCTATGG AAAAAATCCCT TTCGCATCCA GGTAGTGCGT	480
CTCTTGACCC CCCTGGTGGA CCCTTTCCCC ATTCCCAACG TAGCCAATGC CACAGCCCCGT	540
GTGGCCGACA AGGTTGTTTG GCAGACGTCC CCGAAGACGT TCAGGAAAAA CTTGCATCCG	600
CAGCATAAGA TGTGAAGGA TACAGTTCTT GATATTATCA AGCCGGGGCA CGGAGAGTAT	660
GTGGGTTGGG GAGAGATGGG AGGCATCGAG TTTATGAAGG AGCCAACATT CATGAATTAT	720

TTCAACTTTG ACAATATGCA ATATCAGCAG GTCTATGCAC AAGGCGCTCT TGATAGTCGT	780
GAGCCGTTGT ATCACTCTGA TCCCTTCTAT CTCGACGTGA ACTCCAACCC AGAGCACAAG	840
AACATTACGG CAACCTTTAT CGATAACTAC TCTCAGATTG CCATCGACTT TGGGAAGACC	900
AACTCAGGCT ACATCAAGCT GGGTACCAGG TATGGCGGTA TCGATTGTTA CGGTATCAGC	960
GCGGATACGG TCCCGGAGAT TGTGCGACTT TATACTGGAC TTGTTGGGCG TTCGAAGTTG	1020
AAGCCCAGGT ATATTCTCGG AGCCCAACAA GCTTGTTATG GATACCAGCA GGAAAGTGAC	1080
TTGCATGCTG TTGTTACAGCA GTACCGTGAC ACCAAGTTTC CGCTTGATGG GTTGCATGTC	1140
GATGTCGACT TTCAGGACAA TTTCAGAACG TTTACCACTA ACCCGATTAC GTTCCCTAAT	1200
CCCAAAGAAA TGTTTACCAA TCTAAGGAAC AATGGAATCA AGTGTTCAC CAACATCACC	1260
CCTGTTATCA GTATCAGAGA TCGCCCGAAT GGGTACAGTA CCCTCAATGA GGGATATGAT	1320
AAAAAGTACT TCATCATGGA TGACAGATAT ACCGAGGGGA CAAGTGGGGA CCCGCAAAAT	1380
GTTCGATACT CTTTTTACGG CGGTGGGAAC CCGGTTGAGG TTAACCCTAA TGATGTTTGG	1440
GCTCGGCCAG ACTTTGGAGA CAATTATGAC TTCCCTACGA ACTTCAACTG CAAAGACTAC	1500
CCCTATCATG GTGGTGTGAG TTACGGATAT GGGAAATGGCA CTCCAGGTTA CTACCCTGAC	1560
CTTAACAGAG AGGAGGTTGG TATCTGGTGG GGATTGCAGT ACGAGTATCT CTTCAATATG	1620
GGACTAGAGT TTGTATGGCA AGATATGACA ACCCCAGCGA TCCATTCATC ATATGGAGAC	1680
ATGAAAGGGT TGCCCACCCG TCTGCTCGTC ACCGCCGACT CAGTTACCAA TGCCCTGAG	1740
AAAAAGCTCG CAATTGAAAG TTGGGCTCTT TACTCCTACA ACCTCCATAA AGCAACCTTC	1800
CACGGTCTTG GTCGTCTTGA GTCTCGTAAG AACAAACGTA ACTTCATCCT CGGACGTGGT	1860
AGTTACGCCG GTGCCTATCG TTTTGCTGGT CTCTGGACTG GAGATAACGC AAGTACGTGG	1920
GAATTCTGGA AGATTTCGGT CTCCCAAGTT CTTTCTCTAG GTCTCAATGG TGTGTGTATA	1980
GCGGGGTCTG ATACGGGTGG TTTTGAGCCC GCACGTACTG AGATTGGGGA GGAGAAATAT	2040
TGCAGTCCGG AGCTACTCAT CAGGTGGTAT ACTGGATCAT TCCTTTTGCC ATGGCTTAGA	2100
AACCACTACG TCAAGAAGGA CAGGAAATGG TTCCAGGAAC CATAACGCGTA CCCCAGCAT	2160
CTTGAAACCC ATCCAGAGCT CGCAGATCAA GCATGGCTTT ACAAATCTGT TCTAGAAATT	2220
TGCAGATACT GGGTAGAGCT AAGATATTCC CTCATCCAGC TCCTTTACGA CTGCATGTTC	2280
CAAAACGTGG TCGATGGTAT GCCACTTGCC AGATCTATGC TCTTGACCGA TACTGAGGAT	2340
ACGACCTTCT TCAATGAGAG CCAAAGTTC CTCGATAACC AATATATGGC TGGTGACGAC	2400

(2)配列番号 9 の情報:

(A)長さ：317アミノ酸  
(B)型：アミノ酸  
(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号: Modified-site  
(B)存在位置: 201  
(D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸を表す"

Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Pro Asp Leu  
1 5 10 15  
Ile Pro Pro Gly His Asp Ser Asp Pro Asp Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr  
20 25 30  
Phe Ala Ala Pro Trp Val Ile Ala His Gly Tyr Arg Gly Thr Ser Asp  
35 40 45

Gln	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Tyr	Thr		
50						55					60						
Asn	Thr	Gly	Asp	Asp	Ala	Trp	Ala	Gly	Gln	Lys	Asp	Leu	Ala	Tyr	Met		
65					70					75					80		
Gly	Ala	Gln	Cys	Gly	Pro	Phe	Asp	Gln	His	Phe	Val	Tyr	Glu	Ala	Gly		
				85					90					95			
Asp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Val	Thr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Leu	Gln	Gly	Lys		
			100					105					110				
Glu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Gly	Leu	Asn	Ile	Arg	Ser	Ala	Met	Pro	Pro	Lys		
		115					120					125					
Tyr	Val	Phe	Gly	Phe	Phe	Gln	Gly	Val	Phe	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu		
	130					135					140						
Arg	Asp	Asn	Leu	Pro	Ala	Gly	Glu	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Ile		
145					150					155					160		
Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Asn	Gln	Asn	Val	Pro	Phe	Glu	Gly	Leu	Ala	Val		
				165					170					175			
Asp	Val	Asp	Met	Gln	Asp	Asp	Leu	Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Arg	Pro	Ala		
			180					185					190				
Phe	Trp	Thr	Ala	Asn	Lys	Val	Gly	Xaa	Gly	Gly	Asp	Pro	Asn	Asn	Lys		
		195					200					205					
Ser	Val	Phe	Glu	Trp	Ala	His	Asp	Arg	Gly	Leu	Val	Cys	Gln	Thr	Asn		
		210				215					220						
Val	Thr	Cys	Phe	Leu	Lys	Asn	Glu	Lys	Asn	Pro	Tyr	Glu	Val	Asn	Gln		
225					230					235					240		
Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Gln	Leu	Tyr	Thr	Lys	Ser	Asp	Ser	Leu	Asp	Asn		
				245					250					255			
Ile	Asp	Phe	Gly	Thr	Thr	Pro	Asp	Gly	Pro	Ser	Asp	Ala	Tyr	Ile	Gly		
			260					265					270				
His	Leu	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gly	Val	Glu	Cys	Asp	Ala	Leu	Phe	Pro	Asp		
		275					280					285					
Trp	Gly	Arg	Pro	Asp	Val	Ala	Gln	Trp	Trp	Gly	Asp	Asn	Tyr	Lys	Lys		
	290					295					300						
Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Trp	Gln	Asp	Met					
305					310					315							

## (2)配列番号10の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 323アミノ酸  
 (B)型: アミノ酸  
 (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: ペプチド

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: Modified-site  
 (B)存在位置: 272  
 (D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸である"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: Modified-site  
 (B)存在位置: 273  
 (D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸である"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: Modified-site  
 (B)存在位置: 274  
 (D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸である"

## (xi)配列: 配列番号10:

Met	Thr	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Ser	Asp	Leu	1	5	10	15
Ile	Ala	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ser	Asp	Pro	Asn	Phe	Tyr	Ile	Pro	Met	Tyr	20	25	30	
Phe	Ala	Ala	Pro	Trp	Val	Val	Val	Lys	Gly	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	Asp	35	40	45	
Glu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Trp	Phe	Met	Asp	Asn	Val	Ser	Gln	Thr	Tyr	50	55	60	
Met	Asn	Thr	Gly	Gly	Thr	Ser	Trp	Asn	Cys	Gly	Glu	Glu	Asn	Leu	Ala	65	70	75	80
Tyr	Met	Gly	Ala	Gln	Cys	Gly	Pro	Phe	Asp	Gln	His	Phe	Val	Tyr	Gly	85	90	95	
Asp	Gly	Asp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Val	Gln	Ala	Phe	Ser	Leu	Leu	Gln	100	105	110	
Gly	Lys	Glu	Phe	Glu	Asn	Gln	Val	Leu	Asn	Lys	Arg	Ala	Val	Met	Pro	115	120	125	
Pro	Lys	Tyr	Val	Phe	Gly	Tyr	Phe	Gln	Gly	Val	Phe	Gly	Ile	Ala	Ser	130	135	140	

Leu Leu Arg Glu Gln Arg Pro Glu Gly Gly Asn Asn Ile Ser Val Ser  
 145 150 155 160  
 Glu Ile Val Glu Gly Tyr Gln Ser Asn Asn Phe Pro Leu Glu Gly Leu  
 165 170 175  
 Ala Val Asp Val Asp Met Gln Gln Asp Leu Arg Cys Ser Ser Pro Leu  
 180 185 190  
 Lys Ile Glu Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Thr Gly Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Asn Asn Lys Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys  
 210 215 220  
 Gln Thr Asn Val Thr Cys Phe Leu Arg Asn Asp Asn Gly Gly Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Tyr Glu Val Asn Gln Thr Leu Arg Glu Lys Gly Leu Tyr Thr Lys Asn  
 245 250 255  
 Asp Ser Leu Thr Asn Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Asp Gly Pro Xaa  
 260 265 270  
 Xaa Xaa Tyr Ile Gly His Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Gly Asn Cys Asp  
 275 280 285  
 Ala Leu Phe Pro Asp Trp Gly Arg Pro Gly Val Ala Glu Trp Trp Gly  
 290 295 300  
 Asp Asn Tyr Ser Lys Leu Phe Lys Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln  
 305 310 315 320  
 Asp Met Thr

## (2)配列番号11の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 202アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: ペプチド

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: Modified-site
- (B)存在位置: 43
- (D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸である"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: Modified-site
- (B)存在位置: 176
- (D)他の情報: /記 = "Xはmisc. アミノ酸である"

## (xi)配列: 配列番号11:

Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Pro Asp Val  
 1 5 10 15  
 Val Pro Pro Gly Tyr His Asp His Pro Asn Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ala Ala Pro Trp Leu Val Val Gln Gly Xaa Ala Gly Thr Ser Lys  
 35 40 45  
 Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Met  
 50 55 60  
 Asn Thr Gly Asp Thr Ala Trp Asn Cys Gly Gln Glu Asn Leu Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gly Ala Gln Tyr Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Gly Asp  
 85 90 95  
 Gly Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Lys Ala Phe Ser Phe Leu Gln Gly  
 100 105 110  
 Lys Glu Phe Glu Asp Lys Lys Leu Asn Lys Arg Ser Val Met Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Tyr Val Phe Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Ala Leu Ser Leu  
 130 135 140  
 Leu Lys Gln Asn Leu Pro Ala Gly Glu Asn Asn Ile Ser Val Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Val Glu Gly Tyr Gln Asp Asn Asp Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Xaa  
 165 170 175  
 Val Asp Val Asp Met Gln Asp Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr Lys Pro  
 180 185 190  
 Glu Tyr Trp Ser Ala Asn Met Val Gly Glu  
 195 200

## (2)配列番号12の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 953塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 二本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (573, "")
- (D)他の情報: /記 = "gはmisc. 核酸である"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference

(B)存在位置：置換 (601, "")

(D)他の情報： /記 = "gはmisc. 核酸である"

(xi)配列：配列番号12：

ATGACAACT ATAATTATGA CAATTTGAAC TACAATCAAC CGGACCTCAT CCCACCTGGC	60
CATGATTCAG ATCCTGACTA CTATATTCGG ATGTACTTTG CGGCACCATG GGTGATCGCA	120
CATGGATATC GTGGCACCAG CGACCAGTAC TCTTATGGAT GGTTTTTTGA CAATGTATCC	180
CAGTCTACA CAAACACTGG CGATGATGCA TGGGCTGGTC AGAAGGATTT GGCGTACATG	240
GGGGCACAAT GTGGGCCTTT CGATCAACAT TTTGTGTATG AGGCTGGAGA TGGACTTGAA	300
GACGTTGTGA CCGCATTCTC TTATTTGCAA GGCAAGGAAT ATGAGAACCA GGGACTGAAT	360
ATACGTTCTG CAATGCCTCC GAAGTACGTT TTCGGATTTT TCCAAGGCGT ATTCGGAGCC	420
ACATCGCTGC TAAGGGACAA CTTACCTGCC GGCGAGAACA ACGTCTCTTT GGAAGAAATT	480
GTTGAAGGAT ATCAAAATCA GAACGTGCCA TTTGAAGGTC TTGCTGTGGA TGTTGATATG	540
CAAGATGACT TGAGAGTGTT CACTACGAGA CCGGCGTTTT GGACGGCAAA CAAGGTGGGG	600
GAAGGCGGTG ATCCAAACAA CAAGTCAGTG TTTGAGTGGG CACATGACAG GGGCCTTGTC	660
TGCCAGACGA ATGTAACCTG CTTCTTGAAG AACGAGAAAA ATCCTTACGA AGTGAATCAG	720
TCATTGAGGG AGAAGCAGTT GTATACGAAG AGTGATTCCT TGGACAACAT TGATTTTGA	780
ACTACTCCAG ATGGGCCTAG CGATGCGTAC ATTGGACACT TAGACTACGG TGGTGGTGTG	840
GAGTGTGATG CACTATTCCC AGACTGGGGT CGACCAGACG TGGCTCAATG GTGGGGCGAT	900
AACTACAAGA AACTATTCAG CATTGGTCTC GACTTCGTAT GGCAAGACAT GAC	953

(2)配列番号13の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：969塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (814..821, "")

(D)他の情報： /記 = "814と812の間 (およびそれらを含む) それぞれの g は misc. 核酸である"

(xi)配列：配列番号13：

ATGACAACT ACAACTACGA CAACTATAAC TACAACCAGT CAGATCTTAT TGCTCCAGGA	60
TATCCTTCCG ACCCGAACTT CTACATTCCC ATGTATTTTG CAGCACCTTG GGTAGTTGTT	120
AAGGGATGCA GTGGCAACAG CGATGAACAG TACTCGTACG GATGGTTTAT GGATAATGTC	180
TCCCAAACTT ACATGAATAC TGGTGGTACT TCCTGGAAC TGGAGAGGA GAACTTGGCA	240
TACATGGGAG CACAGTGGCG TCCATTTGAC CAACATTTTG TGTATGGTGA TGGAGATGGT	300
CTTGAGGATG TTGTCCAAGC GTTCTCTCTT CTGCAAGGCA AAGAGTTTGA GAACCAAGTT	360
CTGAACAAAC GTGCCGTAAT GCCTCCGAAA TATGTGTTTG GTTACTTTCA GGGAGTCTTT	420
GGGATTGCTT CCTTGTTGAG AGAGCAAAGA CCAGAGGGTG GTAATAACAT CTCTGTTTCA	480
GAGATTGTCG AAGGTTACCA AAGCAATAAC TTCCCTTTAG AGGGGTTAGC CGTAGATGTG	540
GATATGCAAC AAGATTTGCG GTGTAGTTCA CCACTGAAGA TTGAATTTTG GACGGCAAAT	600
AAGGTAGGCA CCGGGGGAGA CTCGAATAAC AAGTCGGTGT TTGAATGGGC ACATGACAAA	660
GGCCTTGAT GTCAGACGAA TGTTACTTGC TTCTTGAGAA ACGACAACGG CGGGGCAGAT	720
TACGAAGTCA ATCAGACATT GAGGGAGAAG GGTGTGTACA CGAAGAATGA CTCACTGACG	780
AACACTAACT TCGGAACTAC CAACGACGGG CCGGGGGGGG GGTACATTGG ACATCTGGAC	840
TATGGTGGCG GAGGGAATTG TGATGCACTT TTCCAGATT GGGGTCGACC GGGTGTGGCT	900
GAATGGTGGG GTGATAACTA CAGCAAGCTC TTCAAATTG GTCTGGACTT CGTGTGGCAA	960
GATATGACA	969

(2)配列番号14の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：607塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (128, "")
- (D)他の情報： /記 = "gはmisc. 核酸である"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (232, "")
- (D)他の情報： /記 = "gはmisc. 核酸である"

## (ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc\_difference

(B)存在位置: 置換 (249, "")

(D)他の情報: /記 = "gはmisc. 核酸である"

## (ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: misc\_difference

(B)存在位置: 置換 (526, "")

(D)他の情報: /記 = "gはmisc. 核酸である"

## (xi)配列: 配列番号14:

ATGACAAACT ACAATTACGA CAACTTGAAC TACAACCAAC CAGACGTCGT TCCTCCAGGT	60
TATCACGACC ATCCCAACTA CTACATTCCA ATGTACTACG CAGCACCGTG GTTGGTCGTT	120
CAGGGATGCG CGGGGACATC GAAGCAATAC TCGTACGGTT GGTTTATGGA CAATGTCTCT	180
CAGTCGTACA TGAACACTGG AGATACGGCG TGGAAGTGG GACAGGAAAA CGTGGCATA	240
ATGGGCGCGC AATACGGGCC ATTTGATCAG CACTTTGTGT ATGGTGATGG AGATGGCCTT	300
GAAGATGTCG TCAAAGCGTT CTCCTTTCTT CAAGGAAAGG AGTTCGAAGA CAAAAA	360
AACAAGCGTT CTGTAATGCC TCCGAAGTAC GTGTTTGGTT TCTTCCAGGG TGTTTT	420
GCACTTTCAC TGTTGAAGCA GAATCTGCCT GCCGGAGAGA ACAACATCTC AGTGCAAGAG	480
ATTGTGGAGG GTTACCAGGA TAACGACTAC CCCTTTGAAG GGCTCGCGGT AGATGTTGAT	540
ATGCAAGATG ATCTGCGAGT GTTTACTACC AAACCAGAAT ATTGGTCGGC AAACATGGTA	600
GGCGAAG	607

## (2)配列番号15の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ: 90アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: ペプチド

## (xi)配列: 配列番号15:

Tyr	Arg	Trp	Gln	Glu	Val	Leu	Tyr	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Asn	Ala	Ala
1				5					10					15	
Phe	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	Lys	Ala	Ala	Ser	Met	Tyr	Asn	Asn	Asp	Ser
			20					25					30		
Asn	Val	Arg	Arg	Ala	Gln	Asn	Asp	His	Phe	Leu	Leu	Gly	Gly	His	Asp
	35					40						45			

Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu  
 50 55 60  
 Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala  
 85 90

## (2)配列番号16の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 23塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (9, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (12, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (18, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (21, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

(xi)配列：配列番号16：

ATGTANAANA ANGANTCNAAGT

23

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはTまたはCである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはCまたはTである"

(xi)配列：配列番号17：

ATGTANAANA ANGANAGNAAGT

23

(2)配列番号18の情報：

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 17塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (3, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (9, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (12, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (xi)配列: 配列番号18:

TANCCNTCNT GNCCNCC

17

## (2)配列番号19の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: DNA (genomic)

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference

(B)存在位置：置換 (3, "")

(D)他の情報： /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (6, "")

(D)他の情報： /記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (9, "")

(D)他の情報： /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (12, "")

(D)他の情報： /記 = "NはGまたはAである "

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (18, "")

(D)他の情報： /記 = "NはCまたはTである "

(xi)配列：配列番号19：

GGNCCNAANT TNTACCANTG

20

(2)配列番号20の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：17塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (3, "")

(D)他の情報： /記 = "NはTまたはCである"

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (6, "")

(D)他の情報： /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである "

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (12, "")

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (15, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(xi)配列：配列番号20：

TANCGNTGGC ANGANGT

17

(2)配列番号21の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：17塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (3, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (6, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (12, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (15, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(xi)配列：配列番号21：

TANAGNTGGC ANGANGT

17

(2)配列番号22の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：71塩基対

(B)型：核酸

- (C)鎖の数：二本鎖  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号22：

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGCGGC 60  
CACGACGGTT A 71

(2)配列番号23の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23アミノ酸  
(B)型：アミノ酸  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号23：

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Gly Gly His Asp Gly  
20

(2)配列番号24の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：160塩基対  
(B)型：核酸  
(C)鎖の数：二本鎖  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号24：

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGTGGG 60  
CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG AGAATTCGAC CGAACCGGAAT 120  
TGTACTTGCC CGTGCTGACC CAATGGTACA AATTCGGCCC 160

(2)配列番号25の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：54アミノ酸

(B)型：アミノ酸  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号25：

Met	Tyr	Asn	Asn	Asp	Ser	Asn	Val	Arg	Arg	Ala	Gln	Asn	Asp	His	Phe
1				5				10					15		
Leu	Leu	Gly	Gly	His	Asp	Gly	Tyr	Arg	Ile	Leu	Cys	Ala	Pro	Val	Val
		20					25					30			
Trp	Glu	Asn	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Tyr	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln
	35					40					45				
Trp	Tyr	Lys	Phe	Gly	Pro										
	50														

(2)配列番号26の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：238塩基対  
(B)型：核酸  
(C)鎖の数：二本鎖  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号26：

TACAGGTGGC	AGGAGGTGTT	GTACACTGCT	ATGTACCAGA	ATGCGGCTTT	CGGGAAACCG	60
ATTATCAAGG	CAGCTTCCAT	GTACGACAAC	GACAGAAACG	TTCGCGGCGC	ACAGGATGAC	120
CACTTCCTTC	TCGGCGGACA	CGATGGATAT	CGTATTTTGT	GTGCACCTGT	TGTGTGGGAG	180
AATACAACCA	GTCGCGATCT	GTACTTGCCT	GTGCTGACCA	GTGGTACAAA	TTCGGCCC	238

(2)配列番号27の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：79アミノ酸  
(B)型：アミノ酸  
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号27：

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg  
 20 25 30  
 Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp  
 35 40 45  
 Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr Thr Ser  
 50 55 60  
 Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe Gly  
 65 70 75

## (2)配列番号28の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ:28塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

## (ii)配列の種類:cDNA

## (xi)配列:配列番号28:

GCTCTAGAGC ATGTTTTCAA CCCTTGCG

28

## (2)配列番号29の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ:36塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:二本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

## (ii)配列の種類:DNA (genomic)

## (xi)配列:配列番号29:

AGCTTGTTAA CATGTATCCA ACCCTCACCT TCGTGG

36

## (2)配列番号30の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ:34塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:二本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列：配列番号30：

ACAATTGTAC ATAGGTTGGG AGTGGGAAGCA CCGC

34

(2)配列番号31の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：75アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号31：

Lys	Asn	Leu	His	Pro	Gln	His	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Leu	Asp
1				5					10					15	
Ile	Val	Lys	Pro	Gly	His	Gly	Glu	Tyr	Val	Gly	Trp	Gly	Glu	Met	Gly
			20					25					30		
Gly	Ile	Gln	Phe	Met	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Met	Asn	Tyr	Phe	Asn	Phe
	35					40					45				
Asp	Asn	Met	Gln	Tyr	Gln	Gln	Val	Tyr	Ala	Gln	Gly	Ala	Leu	Asp	Ser
50					55						60				
Arg	Glu	Pro	Leu	Tyr	His	Ser	Asp	Pro	Phe	Tyr					
65					70					75					

(2)配列番号32の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (3, "")
- (D)他の情報：／記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (9, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (15, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (18, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (21, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号32：

CANCANAANA TGCTNAANGA NAC

23

(2)配列番号33の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：23塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (3, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (6, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (9, “”)

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAである”

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (18, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (21, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

## (xi)配列: 配列番号33:

CANCANAANA TGTTNAANGA NAC

23

## (2)配列番号34の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: cDNA

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (3, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (9, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (12, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (18, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (xi)配列: 配列番号34:

TANAANGGNT CNCTNTGNTA

20

## (2)配列番号35の情報:

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: cDNA

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (3, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (9, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (12, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

## (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (18, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAである"

(xi)配列: 配列番号35:

**TANAANGGNT CNGANTGNTA**

**20**

(2)配列番号36の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 37塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(xi)配列: 配列番号36:

**AAACTGCAGC TGGCGCGCCA TGGCAGGATT TTCTGAT**

**37**

(2)配列番号37の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 23塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (9, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (12, "")
- (D)他の情報: /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc\_difference
- (B)存在位置: 置換 (15, "")

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (18, "")

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (21, "")

(D)他の情報： /記 = “NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号37：

ATGACNAANT ANAANTANGA NAA

23

(2)配列番号38の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：21塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (1, "")

(D)他の情報： /記 = “NはAまたはGである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (4, "")

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (13, "")

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (16, "")

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_difference

(B)存在位置：置換 (19, "")

(D)他の情報： /記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(xi)配列：配列番号38：

NTGNGGCATC ATNGCNGGNA C

21

(2)配列番号39の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報： /記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報： /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報： /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報： /記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc\_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報： /記 = "NはGまたはAである"

(xi)配列：配列番号39：

GTCATNTCNT GCCANACNAA NTC

23



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

生存に関する証明書の名宛人 原寄託についての受託証  
の名称および住所 次の頁に記載されている  
デマーク、コペンハーゲン、ティネー1001、国際寄託当局が規則10.2に  
ビートル17、リッペンガート1. 従って発行した  
ゲニコ ハイテクノロジー

<b>I. 寄託者</b> 名称：同上 住所：	<b>II. 微生物の表示</b> 国際寄託当局により与えられた 受託番号： NCIMB 40652 寄託または移送の日付： 1994年6月20日
<b>III. 生存に関する証明</b> 上記IIに表示された微生物の生存を1994年6月22日に試験した 2. この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していた <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していなかった	

- <sup>1</sup> 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、  
関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。
- <sup>2</sup> 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試  
験のことを指す。
- <sup>3</sup> 該当する四角に×印を付ける。

<b>IV. 生存試験を行った条件<sup>4</sup></b>	
<b>V 国際寄託当局</b>	
名称：エヌシーアイエムビー リミテッド 住所：イギリス国 エービー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マシュー ドライブ 23	国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年6月30日

<sup>4</sup> 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰  
性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所  
デニマルク、コペンハーゲン、ティネー1001、  
ビョービーク17、リッゲアムカート1。  
ダニスコ バイオテクノロジー

原寄託についての受託証

この頁の下部に記載されて  
いる国際寄託当局が規則  
7.1に従って発行した

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： Escherichia coli DH5α-pGL2	国際寄託当局により与えら れた受託番号： NCIMB 40653
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年6月20日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称：エシリア・コリ・リミテッド 住所：イギリス国 エービー2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチー ドライヴ 23	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付：1994年6月30日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を  
取得した日付となる。

特許手続上の

## 微生物の寄託の国際的承認

## に関するブダペスト条約

## 国際様式

生存に関する証明書の名宛人

原寄託についての受託証

の名称および住所

次の頁に記載されている

デマーク、コペンハーゲン、ティエー1001、国際寄託当局が規則10.2に  
 ビーロー17、リッゲンロート1、  
 デニスコバイオテクノロジー  
 従って発行した

I. 寄託者	II. 微生物の表示
名称：同上	国際寄託当局により与えられた
住所：	受託番号：
	NCIMB 40653
	寄託または移送の日付：
	1994年6月20日
III. 生存に関する証明	
上記IIに表示された微生物の生存を1994年6月22日に試験した	
2. この日に当該微生物は	
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していた	
<input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していなかった	

<sup>1</sup> 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、  
 関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。

<sup>2</sup> 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試  
 験のことを指す。

<sup>3</sup> 該当する四角に×印を付ける。

IV. 生存試験を行った条件 <sup>4</sup>	
V 国際寄託当局	
名称：エヌシーアイエムビー・リミテッド	国際寄託当局の代表者または
住所：イギリス国 エービー-2 リーウェイ	事務局長の署名（署名）
スコットランド アバディーン セント	日付：1994年6月30日
マチャー トライヴ 23	

<sup>4</sup> 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰  
 性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所 デンマーク、コペンハーゲン、ティエーゲ-1001、 ビーローヒ-17、ラングブローグ-1. デニスコ ハイテクノロジー	<u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した
--	--

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： Escherichia coli K12 DH5α-pMC	国際寄託当局により与えら れた受託番号： NCIMB 40687
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された(転換要請受理の日付)。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称：エシコアイムビ- リミテッド 住所：イギリス国 エービー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチー ドライヴ 23	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付：1994年10月6日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を  
取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

生存に関する証明書の名知人 原寄託についての受託証  
 の名称および住所 次の頁に記載されている  
 デンマーク、コペンハーゲン、ティネー1001、国際寄託当局が規則10.2に  
 ビーオービー-17、リッゲアロッド1. 従って発行した  
 デニスコ バイオテクノロジー

<b>I. 寄託者</b> 名称：同上 住所：	<b>II. 微生物の表示</b> 国際寄託当局により与えられた 受託番号： NCIMB 40687 寄託または移送の日付： 1994年10月3日
<b>III. 生存に関する証明</b> 上記 II に表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した 2. この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していた <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していなかった	

- <sup>1</sup> 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、  
 関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。  
<sup>2</sup> 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試  
 験のことを指す。  
<sup>3</sup> 該当する四角に×印を付ける。

<b>IV. 生存試験を行った条件<sup>4</sup></b>	
<b>V 国際寄託当局</b>	
名称：エヌシーアイエムビー リミテッド 住所：イギリス国 エービー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチャー ドライヴ 23	国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日

<sup>4</sup> 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰  
 性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所  
デソマ-ク、ヨハ-ン-ゲ-ル-ケ-、デ-ラー-1001、  
ヒ-ー-ル-17、ラング-ブ-ル-1.  
ゲ-ス-ハ-イ-テ-ロ-ツ-

原寄託についての受託証

この頁の下部に記載されて  
いる国際寄託当局が規則  
7.1に従って発行した

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： Escherichia coli K12 DH5α-pMV1	国際寄託当局により与えら れた受託番号： NCIMB 40688
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称：エシ-ア-イ-エ-リ-ミ-タ- 住所：イ-リ-ス-国 エ-ル-2 17-ル-イ ス-コ-ラ-ン-ト ア-ハ-デ-ン-セ-イ-ト マ-ル-ト-ラ-イ-ブ 23	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付：1994年10月6日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を  
取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

生存に関する証明書の名宛人      原寄託についての受託証  
の名称および住所      次の頁に記載されている  
デンマーク、コペンハーゲン、ティネー1001、国際寄託当局が規則10.2に  
ビーオービー17、ランゲブーガート1、      従って発行した  
ダニスコ バイオテクノロジー

<b>I. 寄託者</b> 名称：同上 住所：	<b>II. 微生物の表示</b> 国際寄託当局により与えられた 受託番号： NCIMB 40688 寄託または移送の日付： 1994年10月3日
<b>III. 生存に関する証明</b> 上記IIに表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した 2. この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していた <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していなかった	

- <sup>1</sup> 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、  
関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。  
<sup>2</sup> 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試  
験のことを指す。  
<sup>3</sup> 該当する四角に×印を付ける。

<b>IV. 生存試験を行った条件<sup>4</sup></b>	
<b>V 国際寄託当局</b>	
名称：エヌシーアイエムビー リミテッド 住所：イギリス国 エービー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチャー ドライヴ 23	国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日

<sup>4</sup> 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所 デンマーク、コペンハーゲン、ティエー-1001、 ビーオービー-17、リッゲア・カール・1. デニス ハイテノッテ	<u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した
--	--

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： Esherichia coli K12 DH5 $\alpha$ - pMV2	国際寄託当局により与えられた受託番号： NCIMB 40689
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換する要請は受理された。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称：エシリア・コリ リミテッド 住所：イギリス国 イースト・2 17-ルワイ スコットランド、アバディーン・セイント マチャート・ドライブ 23	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付：1994年10月6日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
 に関するブダペスト条約  
 国際様式

生存に関する証明書の名宛人 原寄託についての受託証  
 の名称および住所 次の頁に記載されている  
 デンマーク、コペンハーゲン、ティエーネ-1001、国際寄託当局が規則10.2に  
 ビーロービ-17、ランゲブローグ-1、 従って発行した  
 デニスコ バイテクノロジー

I. 寄託者	II. 微生物の表示
名称：同上	国際寄託当局により与えられた 受託番号：
住所：	NCIMB 40689 寄託または移送の日付： 1994年10月3日
III. 生存に関する証明	
上記IIに表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した <sup>2</sup> 。この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していた <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> 生存していなかった	

- <sup>1</sup> 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。  
<sup>2</sup> 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試験のことを指す。  
<sup>3</sup> 該当する四角に×印を付ける。

IV. 生存試験を行った条件 <sup>4</sup>	
V 国際寄託当局	
名称：エヌシーアイエムビー リミテッド 住所：イギリス国 エービー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セイント マチャー ドライブ 23	国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日

<sup>4</sup> 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

補遺 3

14頁

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所 デンマー、コペンハーゲン、ティエー1001、 ビーロー17、リッゲフロード1 デニス・ハイデルボーク	<u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した
---	--

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： 株番号: GLQ-1 (Qingdao)	国際寄託当局により与えられた受託番号： CCAP 1373/1
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年5月10日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換する要請は受理された (転換要請受理の日付)。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称: カルチャー コレクション オブ アルター アト・プロトタイプ	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名
住所: イギリス国 ビーイー34 4エーディー、 アキル、オハツ、ビー・オー・ボックス 3、 デンスタッフネイズ マリッ ラボラトリー	(署名) 日付: 1994年11月10日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる。

## 補遺 3

14頁

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約  
国 際 様 式

寄託者の氏名および住所 デンマーク、コペンハーゲン、ティネー1001、 ビーロー17、ラングブロー1 デンマーク ハイテクノロジー	原寄託についての受託証 この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した
--	---

<b>I. 微生物の表示</b>	
寄託者による識別のための表示： 株番号: GLSC-1 (California)	国際寄託当局により与えられた受託番号： CCAP 1373/2
<b>II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：</b>	
I で表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける)	
<b>III. 受託および受理</b>	
この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年5月10日 (原寄託の日付) <sup>1</sup> に受け付けて受理している	
<b>IV. 転換のための請求の受託</b>	
上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換する要請は受理された (転換要請受理の日付)。	
<b>V. 国際寄託当局</b>	
名称: カルチャーコレクション オブ アルゲー アトモスフィア	国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名)
住所: イギリス国 ビーロー 34 4エディン、 アール、オックス、ビーロー、ボックス 3、 ダウンスタッフネイズ マリッ ラボラトリ	日付: 1994年11月10日

<sup>1</sup> 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる。

【 図 1 】

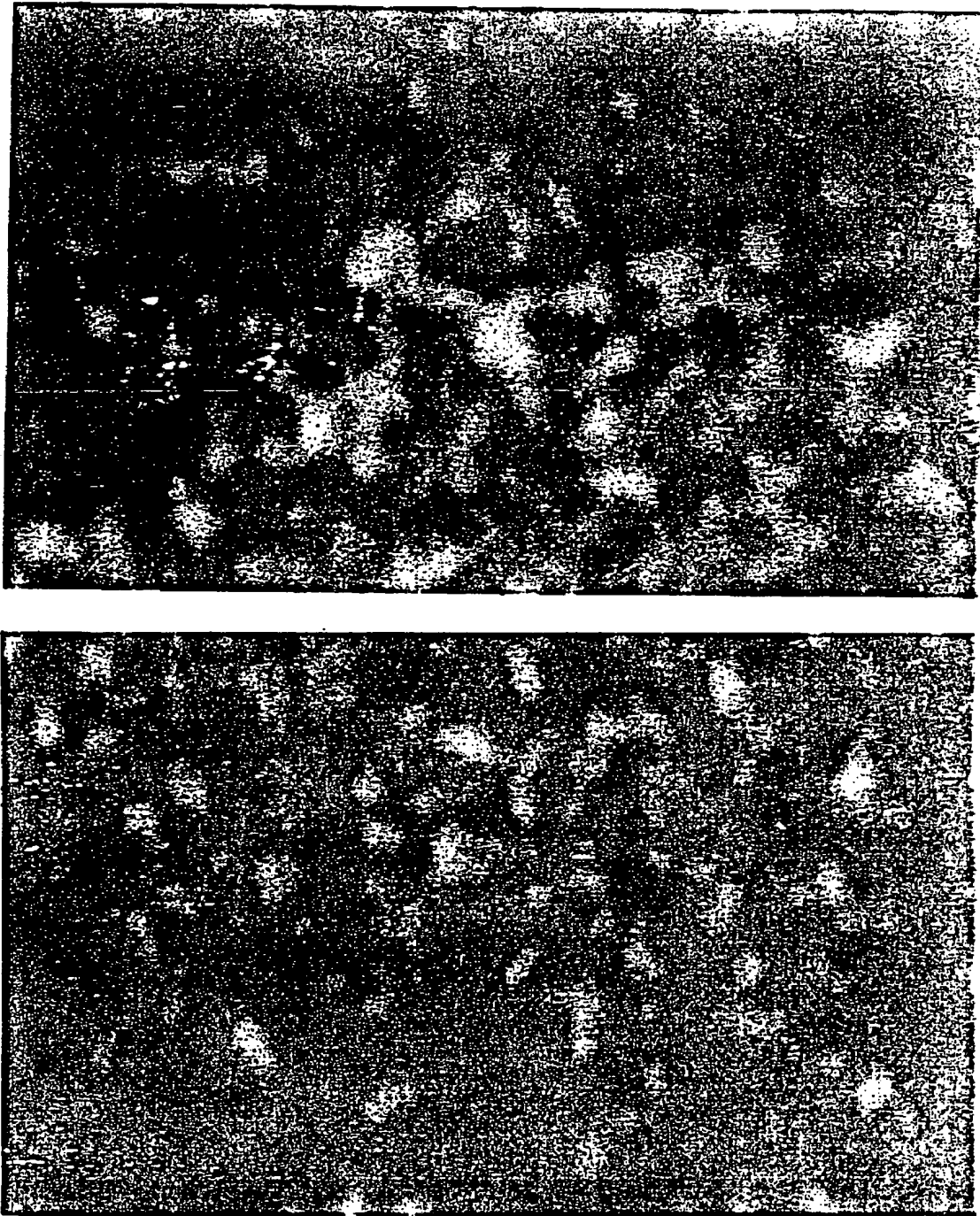


Fig. 1. *Gracilaria lemaneiformis*の上部および下部での菌類を表すCalcofluor White染色。(108×および294×)。

【 図 2 】



Fig. 2. 菌類を有するGracilaria lemaneiformisのPAS/Anilinblue Black染色。  
菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

【 図 3 】



Fig. 3. 顕微鏡写真は藻類細胞の厚い壁 (w) 間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸 (f) の縦方向で表面付近の切片を示す。藻類のクロロプラスト中のチコライド膜に留意 (矢印)。

【 図 4 】

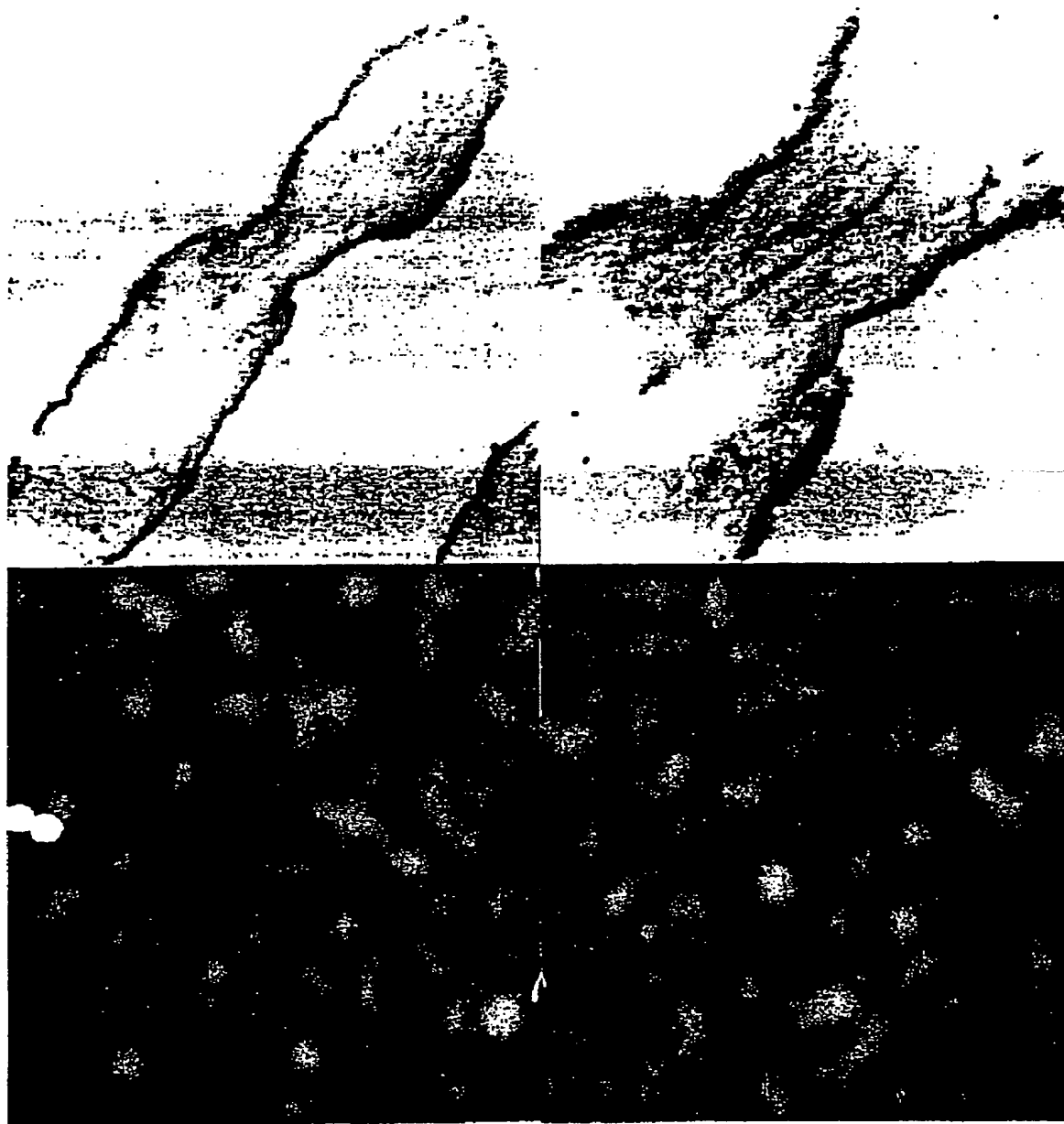


Fig. 4. クローン2プローブを用いたアンチセンス検出（上列）は、次の切片のCalcofluor White染色（下列）により示される菌類に限定されている。（46×および108×）。

【 図 5 】

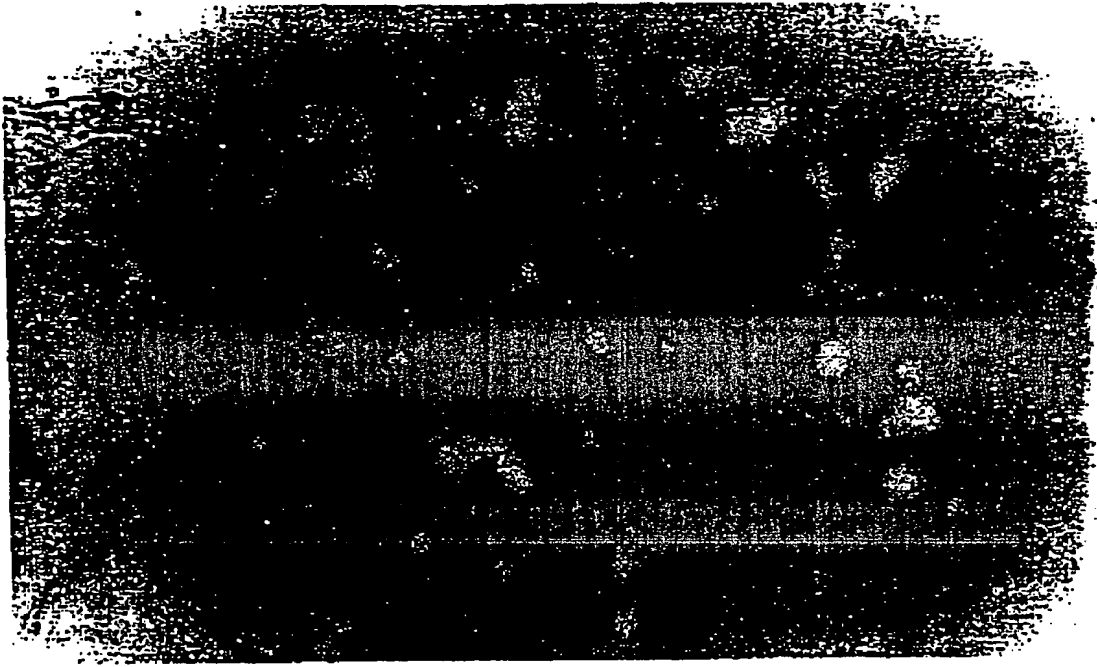
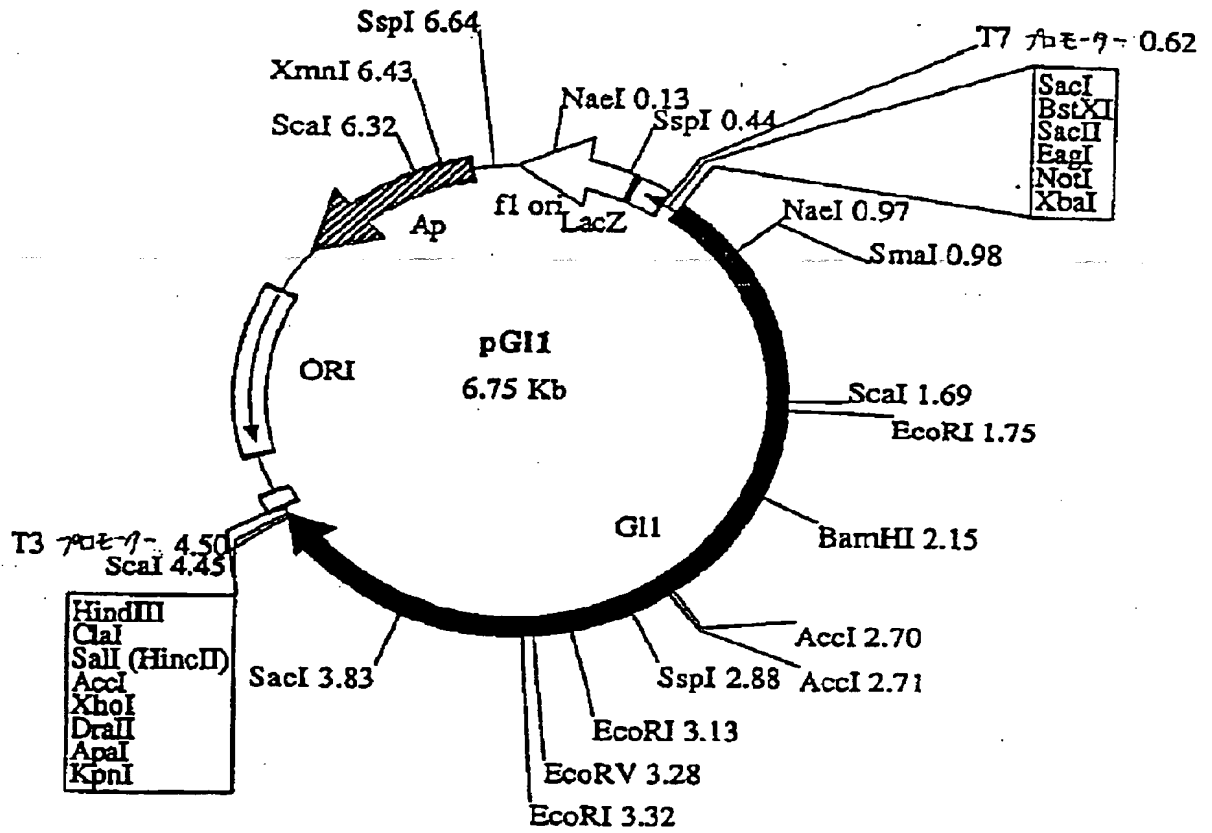


Fig. 5. プローブ 2 を用いた強いアンチセンス検出が *Gracilaria lemaneiformis* 中の菌類上に見出される (294×)。

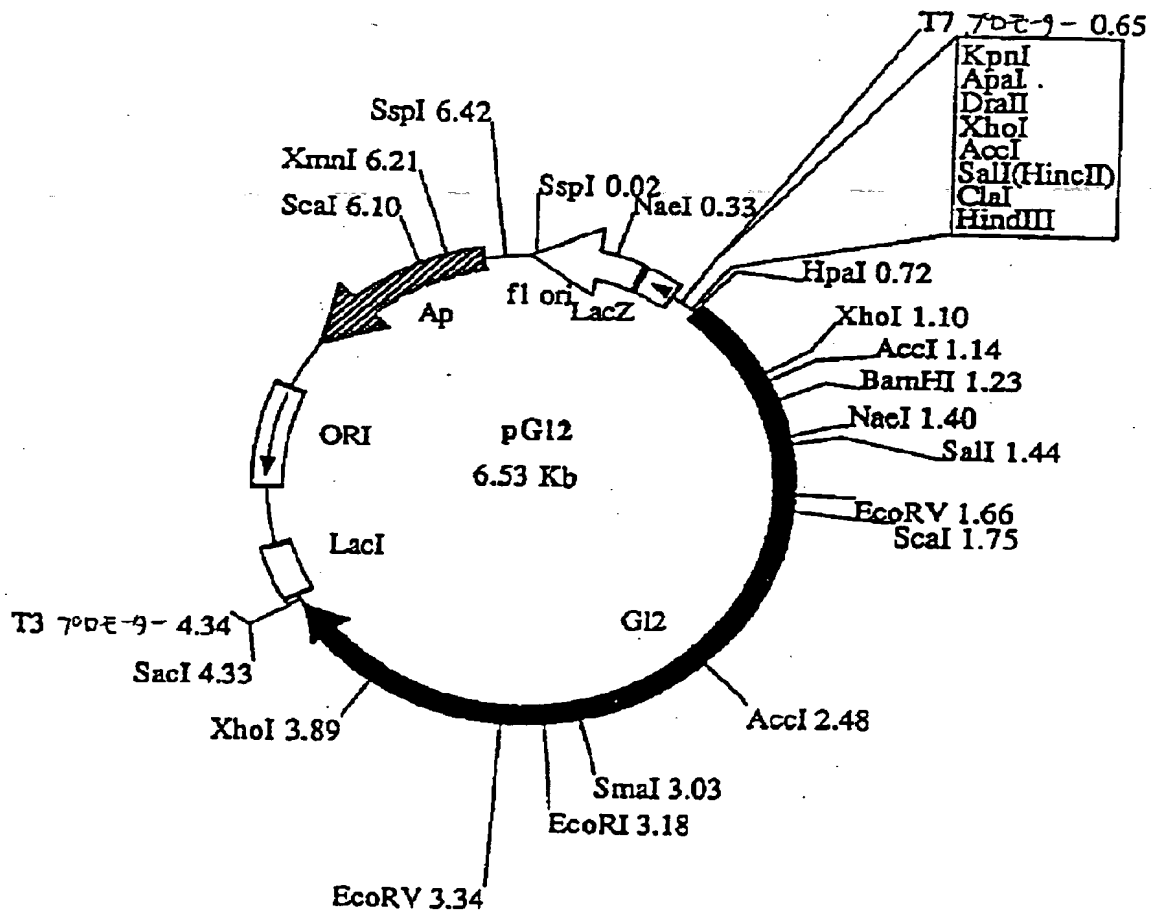
【 図 6 】

Fig. 6.



【 図 7 】

Fig. 7.



【 図 8 】

FIGURE 8

MFSTLAFVAP	SALGASTFVG	AEVRSNVRIH	SAFPAVHTAT	RKTNRLNVSM	TALSDKQTAT	AGSTDNPDGI
DYKTYDYVGV	WGFSPLSNTN	WFAAGSSTPG	GITDWTATMN	VNFDRIDNPS	ITVQHPVQVQ	VTSYNNNSYR
VRFNPDGPIR	DVTRGPILKQ	QLDWIRTQEL	SEGCDPGMTF	TSEGFLTFTET	KDLSVIIYGN	FKTRVTRKSD
GKVIMENDEV	GTASSGNKCR	GLMFVDRLYG	NAIASVNKNE	RNDVAKQEGF	YGAGEVNCKY	QDTYILERTG
IAMTNYNYN	LNYNQWDLRP	PHHDGALNPD	YYIPMYAAP	WLIVNGCAGT	SEQYSYGWFM	DNVSQSYMNT
GOTTWNSGQE	DLAYMGAQYG	PFDQHFVYGA	GGGMECVTA	FSLLOGKEFE	NQVLNKR SVM	PPKYVFGFFQ
GVFGTSSLLR	AHMPAGENNI	SVEEIVEGYQ	NNNFPFEGLA	VDVDMQDNLR	VFTTKGEFWT	ANRVGTGGDP
NNRSVFEWAH	DKGLVCQTN	TCFLRNDNEG	QDYEVTOTLR	ERQLYTKNDS	LTGTDFGMD	DGPSDAYIGH
LDYGGGVECD	ALFPDWGRPD	VAEWWGNMYK	KLFSIGLDFV	WQDMTPPAMM	PHKIGDDINV	KPDGNWPNAD
DPSNGQYNWK	TYHPQVLVTO	MRYENHGREG	MYTORNIHAY	TLCESTRKEG	IVENADTLTK	FRSYIISRG
GYIGNQHFGG	MWVGDNSTTS	NYIQMMIANN	INNMMSCLPL	VGSDIGGFTS	YDNENQRTPC	TGDLMVRYVQ
AGCLLPWFRN	HYDRWIESKD	HGKDYQELYM	YPNEMDTLRK	FVEFRYRWQE	VLYTAMYONA	AFGKPIIKAA
SMYNNDNSNR	RAQNDHFLG	GHDGYRILCA	PVVWENSTER	ELYLPVLTQW	YKFGPDFOTK	PLEGAMNGGO
RIYNYPVPQS	ESPIFVREGA	ILPTRYTLNG	ENKSLNTYTD	EDPLVFEVFP	LGNNRADGMC	YLDDGGVTTN
AEDNGKFSVY	KVAAEQDGGT	ETITFTNDY	EYVFGGPFYV	RVRGAQSPSN	IHVSSGAGSQ	DMKVSSATSR
AALFNDGENG	DFWVDOETDS	LWLKLPNVVL	PDVITIT			

[ 图 9 ]

FIGURE 9

GL1	- MFSTLAFVAPSALGASTFVGAEV-RSNVRIHSAFPAVHTATRKTNRNLNV	-49
GL2	- MYPTLTFVAPSALGARTFTCVGIFRSHILHSVVPVAVRLAVRKSNRNLNV	-50
GL1	- MTALSDKQTATAGSTONPDGIDYKTYDYVGWGFSPLSNTNWFAAGSSTP	-99
GL2	- MSALFDKPTAVTGGKDNPDNINYTTYDYVPVWRFDPLSNTNWFAAGSSTP	-100
GL1	- GGITDWTATMNVNFDRIIDNPSITVQHPVQVQVTSYNNNSYRVRFNPDGPI	-149
GL2	- GDIDDWTATMNVNFDRIIDNPSFTLEKPVQVQVTSYKNNCFRVRFNPDGPI	-150
GL1	- RDVTRGPILKQQLDWIRTQELSEGCDPGMTFTSEGFLTFTKDLNIIYG	-199
GL2	- RDVDRGPILKQQLNWIWKQEQSKGFDPKMGFTKEGFLKFETKDLNIIYG	-200
GL1	- NFKTRVTRKSDGKIVIMENDEVGTASSGNKCRGLMFVDRLYGNAIASVNKN	-249
GL2	- NFKTRVTRKRDGKGIMENNEVPAGSLGNKCRGLMFVDRLYGTAIASVNEN	-250
GL1	- FRNDVAKQEGFYGAGEVNCKYQOT-----YILERTGIAMTNNYNDNLNY	-293
GL2	- YRNDPDRKEGFYGAGEVNCFWQSEQRNKYILERTGIAMTNNYNDNNY	-300
GL1	- NQWDLRPPHHGALNPDIYIPMYAAPWLIVNGCAGTS-EQYSYGWFMDN	-342
GL2	- NQSDLIAP--GYPSDPNFYIPMYFAAPWVVKGCNSDEQYSYGWFMDN	-348
GL1	- VSQSYMNTGDTTWNSGQEDLAYMGAQYGPFDQHFVYGAGGGMECVVTAFS	-392
GL2	- VSQTYMNTGGTSWNCGEENLAYMGAQCGPFDQHFVYGDGGLDGVVQAFS	-398
GL1	- LLQGKEFENQVLNKRSMPPKYVFGFFQGVFGTSSLLRAHMPAGENNISV	-442
GL2	- LLQGKEFENQVLNKRSMPPKYVFGYFQGVFGIASLLREQRPEGGNNISV	-448
GL1	- EEIVEGYQNNNFPFEGLAVDVDMQDNLRVFTTKGEFWTANRVGTGGDPNN	-492
GL2	- QEIVEGYQSNNFPLEGLAVDQDMQDNLRVFTTKIEFWTANKVGTGGDSNN	-498
GL1	- RSVFEWAHDKGLVCQTNITCFLRNDNEGQDYEVNQTLRERQLYTKNDSL	-542
GL2	- KSVFEWAHDKGLVCQTNITCFLRNDNGGADYEVNQTLREKGLYTKNDSL	-548
GL1	- GTDFGMTDDGPSDAYIGHLDYGGGVECDALFPDWGRPDVAEWGNNYKKL	-592
GL2	- NTNFGTTNDGPSDAYIGHLDYGGGGNCALFPDWGRPGVAEWGDNYSKL	-598
GL1	- FSIGLDFVWQDMTPAMMPHKIGDDINVKPDGNWPNADDPNSNGQYNWKTY	-642
GL2	- FKIGLDFVWQDMTPAMMPHKVGDVDTSPYGPWPNENDPSNGRYNWKSY	-648
GL1	- HPQVLVTDMRYENHGREPMVTQRNIHAYTLCSTRKEGIVENADTLTKFR	-692
GL2	- HPQVLVTDMRYENHGREPMFTQRNMHAYTLCSTRKEGIVANADTLTKFR	-698

FIGURE 9 緑道

```
GL1 - RSYIISRGGYIGNQHFGGMWVGDNSTTSNYIQMMIANINNMNMSCLPLVG -742  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - RSYIISRGGYIGNQHFGGMWVGDNSSSQRYLQMMIANIVNMNMSCLPLVG -748  
  
GL1 - SDIGGFTSYDNEHQRTPTGDLMVRYVQAGCLLPWFRNHYDRWIESKDHG -792  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - SDIGGFTSYDG---RNVCPGDLMVRFBVQAGCLLPWFRNHYGRLVEGKQEG -795  
  
GL1 - KDYQELMYMPNEMDTLRKFVEFRYWQEVLYTAMYQNAAF GKPIIKAASM -842  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - KYYQELMYMKDEMATLRKFIEFRYWQEVLYTAMYQNAAF GKPIIKAASM -845  
  
GL1 - YNDSNVRRQAQNDHFLGGHDGYRILCAPVVWENSTERELYLPVL TQWYK -892  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - YDNRNVRGAQQDDHFLGGHDGYRILCAPVVWENTTSRDLYLPVL TKWYK -895  
  
GL1 - FGPDFDTKPLEGAMNGGDRIYNYPVPQSESPIFVREGAILPTRYTLNGEN -942  
      : : : : : : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - FGPDYDTKRLLDSALDGGQMKNYSVPQSDSPIFVREGAILPTRYTL DGSN -945  
  
GL1 - KSLNTYTDEDPLVF EVFPLGNRADGMCYLDDGGVTINAEDNGKFSVVKV -992  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - KSMNTYTDKDPLVF EVFPLGNRADGMCYLDDGGITDAEDHGKFSVIN V -995  
  
GL1 - AA EQDGGTETITFTNOCYEYVFGGPFFYVRVRGAQSPSNIHVSSGAGSQDM -1042  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - EALRKGVTTTTIKFAYDTYQYVFDGPFYVRIRNLTTASKINVSSGAGEEDM -1045  
  
GL1 - KVSSATSRAALFNDGENGFWDQETDSLWLKLPNVLPDAVITIT -1088  
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :  
GL2 - TPTSANSRAALFSDGGVGEYADNDTSSLWMKLPNLVLQDAVITIT -1091
```

【 図 1 0 】

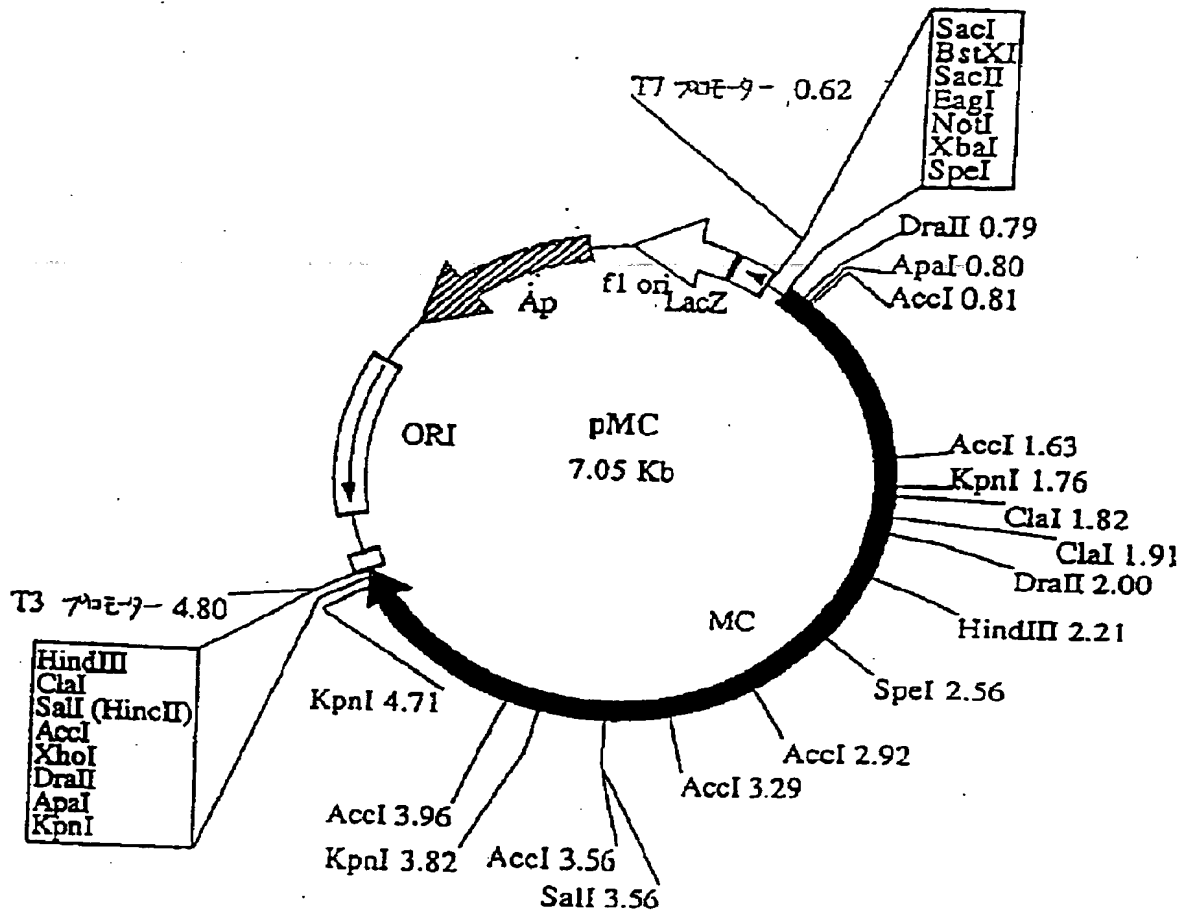


Fig 10. 藻類の壁 (W) 間で成長した菌糸 (f) の顕微鏡写真。藻類細胞中の紅藻デンプン (s) およびチラコイド (矢印) の粒子に留意。

バー =  $2\mu\text{m}$ 。

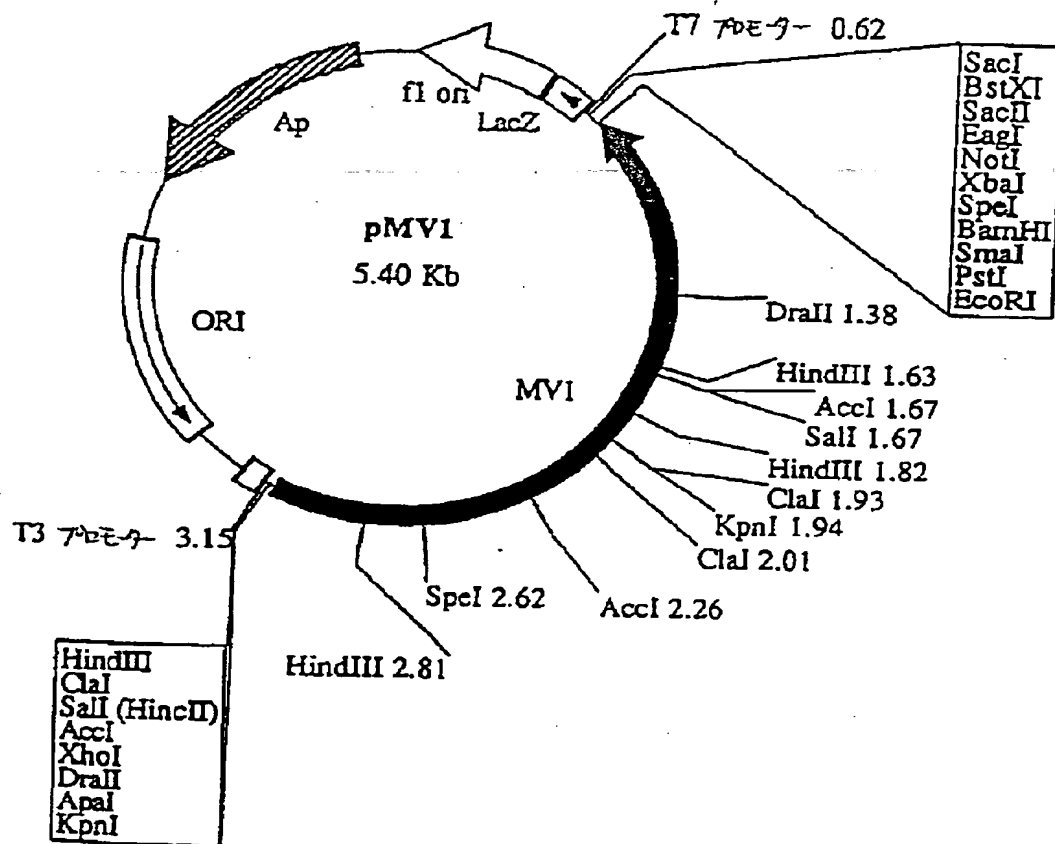
【 図 1 1 】

Fig 11



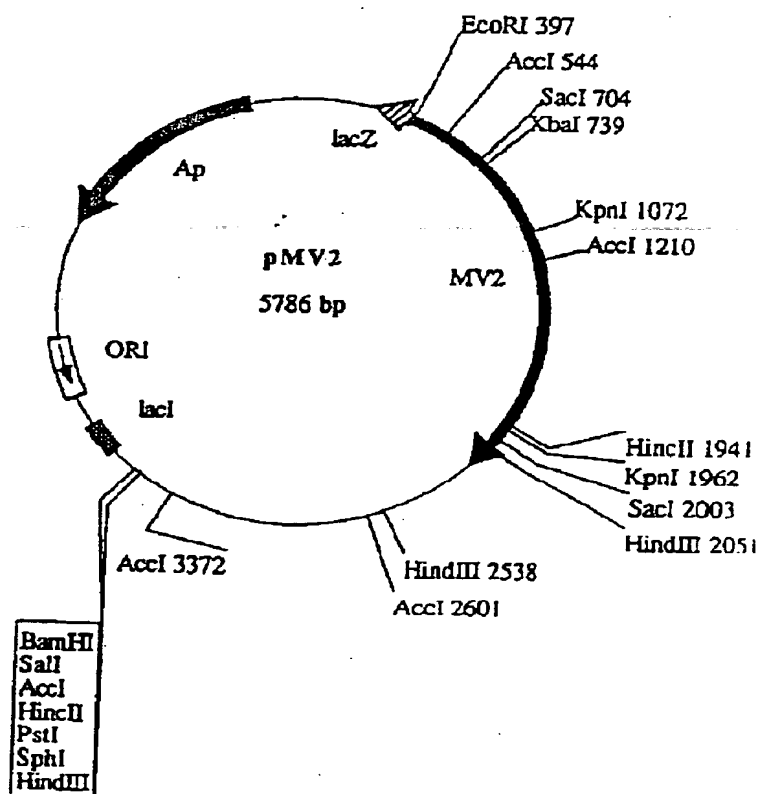
【 図 1 2 】

Fig12



【 図 1 3 】

Fig. 13



【 图 1 4 】

FIGURE 14

	10	20	30	40	50	60
1	AGACAGGTGC	GTTTTGTTT	ATTCTATTCT	GTGCGGCAGA	TATGCACTCA	CAAGAAACAA
61	ATTGTACAAA	TATTTCTAAT	TACAGTTGTA	GGTGCAGTTG	AAAATCCGGT	CGCACAAAGA
121	TCATTGATGC	ACAAAGATGA	TAACGCCTGA	TTAGTACTCA	AGGTTTAATT	GGGTATGTGT
181	GCGACCTCTC	TTTGGCTAGC	ATTACCTGAT	TGGTTACAAC	TGCAAATACT	GCGGCAGCAA
241	TGAGGAATGA	AGTCAGCATC	GATAGCTCGG	CCTCATAAAA	ATTGATTTCA	ATTTTATATT
301	CCCAGTTTTA	ATCTCGAATC	CTATATAATG	GCCATCGTTC	CCTCCTCGCC	TCTTCATTCT
361	CCTCCATCAC	TCCAGCTCAG	TCATCCCTCA	ACTTGGCCTC	CTCTGATATC	TTCCGAACAA
421	AACATCTTGT	CCAATCTTTT	TTTGAGCTAG	ATCTCATTAT	ACCTCCGTCA	TGGCAGGATT
481	TTCTGATCCT	CTCAACTTTT	GCAAAGCAGA	AGACTACTAC	AGTGTTCGCG	TAGACTGGAA
541	GGGCCCTCAA	AAAATCATTG	GAGTAGACAC	TACTCCTCCA	AAGAGCACCA	AGTTECCCCA
601	AAACTGGCAT	GGAGTGAAT	TGAGATTGCA	TGATGGGACT	TAGGTGTGG	TTCAGTTCAT
661	TAGGCCGTGC	GTTTGGAGGG	TTAGATACGA	CCCTGGTTTC	AAGACCTCTG	ACGAGTATGG
721	TGATGAGAAT	<u>ACGTGAGTTA</u>	<u>CCCCATATGT</u>	<u>CATTATTGGT</u>	<u>AGCGAAAAAC</u>	<u>ATATGCTAAT</u>
781	<u>CAACTAACGA</u>	<u>GGCATATAGG</u>	<u>AGGACAATTG</u>	<u>TGCAAGATTA</u>	<u>TATGAGTACT</u>	<u>CTGAGTAATA</u>
841	AATTGGATAC	TTATAGAGGT	CTTACGTGGG	AAACCAAGTG	TGAGGATTGG	GGAGATTTCT
901	TTACCTTCTC	<u>AGTAAGTGCC</u>	<u>AGTACTGCTA</u>	<u>TAGCTCCGCT</u>	<u>ATATATATAA</u>	<u>CACCACTAAC</u>
961	<u>TAACTGCCCT</u>	<u>AAATAGTCCA</u>	<u>AGGTCACCGC</u>	<u>CGTTGAAAAA</u>	<u>TCCGAGCGGA</u>	<u>CCCGCAACAA</u>
1021	GGTCGGCGAT	GGCCTCAGAA	TTCACCTATG	GAAAAGCCCT	TTCCGCATCC	AAGTAGTGCG
1081	CACCTTGACC	CCTTTGAAGG	ATCCTTACCC	CATTCCAAAT	GTAGCCGCAG	CCGAAGCCCG
1141	TGTGTCCGAC	AAGGTCGTTT	GGCAAACGTC	TCCCAAGACA	TTCAGAAAGA	ACCTGCATCC
1201	GCAACACAAG	ATGCTAAAGG	ATACAGTTCT	TGACATTGTC	AAACCTGGAC	ATGGGAGTA
1261	TGTGGGGTGG	GGAGAGATGG	GAGGTATCCA	GTTTATGAAG	GAGCCAACAT	TCATGAACTA
1321	TTTTAGTAAG	<u>CCCCGAAGAG</u>	<u>GTTCCCTTATA</u>	<u>AATTCTTGGT</u>	<u>GGTCATTTTT</u>	<u>ACTAACCCAG</u>
1381	<u>TGTAGACTTC</u>	<u>GACAATATGC</u>	<u>AATACCAGCA</u>	<u>AGTCTATGCC</u>	<u>CAAGGTGCTC</u>	<u>TCGATTCTCG</u>
1441	<u>CGAGCCACTG</u>	<u>TAAGTACCGT</u>	<u>CCTGTGGCAC</u>	<u>GACTTAACCC</u>	<u>AATAACTAAT</u>	<u>CTTTCAACAA</u>
1501	<u>GGTACCACTC</u>	<u>GGATCCCTTC</u>	<u>TATCTTGATG</u>	<u>TGAACTCCAA</u>	<u>CCGGAGCAC</u>	<u>AAGAATATCA</u>

【 図 1 4 】

FIGURE 14 配列

1561 CGGCAACCTT TATCGATAAC TACTCTCAAA TTGCCATCGA CTTTGGAAG ACCAACTCAG  
 1621 GCTACATCAA GCTGGGAACC AGGTATGGTG GTATCGATTG TTACGGTATC AGTGCGGATA  
 1681 CGGTCCCGGA AATTGTACGA CTTTATACAG GTCTTGTTGG ACGTTCAAAG TTGAAGCCCA  
 1741 GATATATTCT CGGGGCCCAT CAAGCCTGTA AGTCCTTCCC CTCATGAGTG ATTTATCAGA  
 1801 CTTGCAATAA AACTAACCT CGTTTCAAA GTTATGGAT ACCAACAGGA AAGTGACTTG  
 1861 TATTCTGTGG TCCAGCAGTA CCGTGACTGT AAATTTCCAC TTGACGGGAT TCACGTCGAT  
 1921 GTGATGTTT AGGTAAATGG CCATGGTATC ATTGAAGCTT TGAGAAATGT TCTAACTGTG  
 1981 TTTATAACAT TCCTAGGACG GCTTCAGAAC TTTACCACC AACCCACACA CTTCCCTAA  
 2041 CCCCAGAGAG ATGTTTACTA ACTTGAGGAA TAATGGAATC AAGTGCTCCA CCAATATCAC  
 2101 TCCTGTTATC AGCATTAACA ACAGAGAGGG TGGATACAGT ACCCTCCTTG AGGGAGTTGA  
 2161 CAAAAAATAC TTTATCATGG ACGACAGATA TACCGAGGGA ACAAGTGGGA ATGCGAAGGA  
 2221 TGTCGGTAC ATGTACTACG GTGGTGGTAA TAAGGTTGAG GTGATCCTA ATGATGTTAA  
 2281 TGGTCGGCCA GACTTTAAAG ACAACTAGTA AGTTGTTTAT TTGACTACGA TAGGTAACCC  
 2341 GTAAGCGGCA TTAACATATT TGTAGTGACT TCCCCGCGAA CTTCAACAGC AAACAATACC  
 2401 CCTATCATGG TGGTGTGAGC TACGATTATG GGAACGGTAG TGTAAGTGAC GATATCTCAC  
 2461 CAACATAATG AAATTTATAA GGACTAACTA GACACAAAAA TTTGTAGGCA GGTTTTTACC  
 2521 CGGACCTCAA CAGAAAGGAG GTTCGTATCT GGTGGGGAAT GCAGTACAAG TATCTCTTCG  
 2581 ATATGGGACT GGAATTTGTG TGGCAAGACA TGAATACCCC AGCAATCCAC ACATCATATG  
 2641 GAGACATGAA AGGGTTGCCC ACCCGTCTAC TCGTCACCTC AGACTCCGTC ACCAATGCCT  
 2701 CTGAGAAAAA GCTCGCAATT GAAACTTGGG CTCTCTACTC CTACAATCTC CACAAAGCAA  
 2761 CTTGGCATGG TCTTAGTCGT CTCGAATCTC GTAAGAACAA ACGAACTTC ATCCTCGGGC  
 2821 GTGGAAGTTA TGCCGGAGCC TATCGTTTTG CTGGTCTCTG GACTGGGGAT AATGCAAGTA  
 2881 ACTGGGAATT CTGGAAGATA TCGGTCTCTC AAGTTCTTTC TCTGGGCTC AATGGTGTGT  
 2941 GCATCGCGGG GTCTGATACG GGTGGTTTTG AACCTACCG TGATGCAAAT GGGGTCGAGG  
 3001 AGAAATACTG TAGCCAGAG CTAATCATCA GGTGGTATAC TGGTTCATTC CTCTGCCGT  
 3061 GGCTCAGGAA CCATTATGTC AAAAAGGACA GGAAATGGTT CCAGGTAATC TATCCTTCT

【 図 1 4 】

FIGURE 14 続き

3121 TATCTTTGAA GCATTGAAGA TACTAAGATA TAATCTAGGA ACCATACTCG TACCCCAAGC  
 3181 ATCTTGAAAC CCATCCAGAA CTCGCAGACC AAGCATGGCT CTATAAATCC GTTTTGGAGA  
 3241 TCTGTAGGTA CTATGTGGAG CTTAGATACT CCCTCATCCA ACTACTTTAC GACTGCATGT  
 3301 TTCAAAACGT AGTCGACGGT ATGCCAATCA CCAGATCTAT GGTATGTATT CTACCCTAGG  
 3361 CTTCCAGAGC AACATATGCT AACCAATTGA ACCTGGGTTT CTAGCTCTTG ACCGATACTG  
 3421 AGGATACCAC CTTCTTCAAC GAGAGCCAAA AGTTCCTCGA CAACCAATAT ATGGCTGGTG  
 3481 ACGACATTCT TGTTCACCCC ATCCTCCACA GTCGCAAAGA AATTCCAGGC GAAAACAGAG  
 3541 ATGTCTATCT CCCTCTTAC CACACCTGGT ACCCCTCAA TTTGAGACCA TGGGACGATC  
 3601 AAGGAGTCGC TTTGGGGAAT CCTGTGGAAG GTGGTAGTGT CATCAATTAT ACTGCTAGGA  
 3661 TTGTTGCACC CGAGGATTAT AATCTCTTCC ACAGCGTGGT ACCAGTCTAC GTTAGAGAGG  
 3721 GTAAGCAGTA AAATAATCTC TTCCAGTTT CAAATACATT TAGCTAGTAG CTAACGCTAT  
 3781 GAACCTACAG GTGCCATCAT CCCGCAAATC GAAGTACGCC AATGGACTGG CCAGGGGGGA  
 3841 GCCAACCGCA TCAAGTTCAA CATCTACCT GGAAGGATA AGGTAAAATT CAATGATCAC  
 3901 CCTGATCTA TTCCATCGCT GGTCTCTTT ACCCTTACTG ACTTCATTCC TCAAAATACA  
 3961 GGAGTACTGT ACCTATCTTG ATGATGGTGT TAGCCGTGAT AGTGCGCCGG AAGACCTCCC  
 4021 ACAGTACAAA GAGACCCACG AACAGTCGAA GGTGAAGGC GCGGAAATCG CAAAGCAGAT  
 4081 TGGAAAGAAG ACGGGTTACA ACATCTCAGG AACCGACCCA GAAGCAAAGG GTTATCACCG  
 4141 CAAAGTTGCT GTCACACAAG TAATACCGCC CTTGACTTGT ATCACTTCCT GACATCATGC  
 4201 TAATATTTCT CTGTTTACCT CAAAGACGTC AAAAGACAAG ACGCGTACTG TCACTATTGA  
 4261 GCCAAACAC AATGGATACG ACCCTTCCAA AGAGGTGGGT GATTATTATA CCATCATTCT  
 4321 TTGGTACGCA CCAGGTTTCG ATGGCAGCAT CGTCGATGTG AGCAAGACGA CTGTGAATGT  
 4381 TGAGGGTGGG GTGGAGCACC AAGTTTATAA GAACTCCGAT TTACATACGG TTGTTATCGA  
 4441 CGTGAAGGAG GTGATCGGTA CCACAAAGAG CGTCAAGATC ACATGTACTG CCGCTTAAAG  
 4501 TCTTTTCTTG GGGGCGGGAG GCGAGACCTT CGAAATGTAT ACGGGAGTGG TAACTCCGGG  
 4561 AAAATGGTGA TATGGGGGAT CAAGTTGGAG GGAATCTGT TTATTTCTTT ATTTCTTTAT  
 4621 TTA CTGGATT GGAAAATAGG GAGCACAGTT CTGACTGGAT TGGTTGATT GTTGGCCTCT  
 4681 ACGGGTTCTC TTTACTTTGT CTGAAATCC AATTTATTGT TATGCG

【 图 1 5 】

FIGURE 15

	10	20	30	40	50	60	
1	ATGCAGGCAA	CGACAGGCGT	TTTTTGT	TTT	ATCCGCAGAG	GTGCAGCAGC	AGGAAACAAA
61	CCATACAAAC	ATTCCTTGAC	GCGGTTTTAG	GTGCAGTTAA	GGCCCGGGCG	CACCAAGAAC	
121	ATTGATGTAC	TTGGTCTAAA	AAAGATCATA	ATACCCGATT	AGTGTTCATG	GTTTGATTGG	
181	GTCTAAGTAC	AAGTTTTACA	GAGTTCAGCT	TAGTTCATTG	TTCGAAACTA	CCAATATCAC	
241	ACCTATGCCT	GCTGGCATTG	ATAGCTCGGC	TTGTGAAAGC	TGATTACAAT	CTTACATTTG	
301	TGATTTAATA	TCGGACTGAT	CTATATATAA	GGGTCATCAT	TTCTCTCCG	CCTTTTGGTT	
361	CTCTTTTCATC	ACCCAGCCC	AATCATCACC	GTTGGCCTTT	ACTTCTCTCT	TCCGTTGATA	
421	TTTTCTCGAC	AAAACATCTT	GTCCACTGTT	AGGCTAGCTC	CCAGAATTAT	CCCTCCAACA	
481	TGGCAGGATT	ATCCGACCCT	CTCAATTTCT	GCAAAGCAGA	GGACTACTAC	GCTGCTGCCA	
541	AAGGCTGGAG	TGGCCCTCAG	AAGATCATTC	GCTATGACCA	GACCCCTCCT	CAGGGTACAA	
601	AAGATCCGAA	AAGCTGGCAT	GCGGTAAACC	TTCTTTTCGA	TGACGGGACT	ATGTGTGTAG	
661	TGCAATTCGT	CAGACCCTGT	GTTTGGAGGG	TTAGATATGA	CCCCAGTGTC	AAGACTTCTG	
721	ATGAGTACGG	CGATGAGAAT	ACGTGGGTCG	CCCAGTCAAT	TAAGTATGCC	GCTAGTGATT	
781	<u>ATGGAAAGCT</u>	<u>TCTGCTAACC</u>	<u>GATCAATGAG</u>	<u>GCATGTAGGA</u>	<u>GGACTATTGT</u>	<u>ACAAGACTAC</u>	
841	ATGACTACTC	TGGTTGAAA	CTTGGACATT	TTAGAGGTC	TTACGTGGGT	TTCTACGTTG	
901	GAGGATTTCG	GCGAGTACTA	CACCTTCAAG	<u>GCAAGCCTCA</u>	<u>GTGTTATATC</u>	<u>TGCAATATAT</u>	
961	<u>TATATATCAC</u>	<u>AACAACTAA</u>	<u>CTAGTCATAC</u>	<u>AGTCCGAAGT</u>	<u>CACTGCCGTG</u>	<u>GACGAAACCG</u>	
1021	AACGGACTCG	AAACAAGGTC	GGCGACGGCC	TCAAGATTTA	CCTATGGAAA	AATCCCTTTC	
1081	GCATCCAGGT	AGTGCCTCTC	TTGACCCCCC	TGGTGGACCC	TTTCCCCATT	CCCAACGTAG	
1141	CCAATGCCAC	AGCCCGTGTG	GCCGACAAGG	TTGTTTGGCA	GACGTCCCCG	AAGACGTTCA	
1201	GGAAAACTT	GCATCCGCAG	CATAAGATGT	TGAAGGATAC	AGTTCTTGAT	ATTATCAAGC	
1261	CGGGGCACGG	AGAGTATGTG	GATTGGGGAG	AGATGGGAGG	CATCGAGTTT	ATGAAGGAGC	
1321	CAACATTTCAT	GAATTATTTT	<u>AGTAAGCTCT</u>	<u>TGAAAGATTT</u>	<u>CCTATCTCTT</u>	<u>GACGGTCGTT</u>	
1381	<u>TTTGCTAAGG</u>	<u>AAACTGTAGA</u>	<u>CTTTGACAAT</u>	<u>ATGCAATATC</u>	<u>AGCAGGTCTA</u>	<u>TGCACAAGGC</u>	
1441	GCTCTTGATA	GTGCTGAGCC	GTTGTAAGTA	ACGTCCTGTG	ACATGTCATG	ATTACAGTAA	
1501	<u>CTGATCGTTC</u>	<u>AATAAGGTAT</u>	<u>CACTCTGATC</u>	<u>CCTTCTATCT</u>	<u>CGACGTGAAC</u>	<u>TCCAACCCAG</u>	

【 図 1 5 】

FIGURE 15 細菌

1561 AGCACAAGAA CATTACGGCA ACCTTTATCG ATAAC TACTC TCAGATTGCC ATCGACTTTG  
1621 GGAAGACCAA CTCAGGCTAC ATCAAGCTGG GTACCAGGTA TGGCGGTATC GATTGTTACG  
1681 GTATCAGCGC GGATACGGTC CCGGAGATTG TGGGACTTTA TACTGGACTT GTTGGGCGTT  
1741 CGAAGTTGAA GCCCAGGTAT ATTCTCGGAG CCCACCAAGC TTGTAAGCCC GCCCCCTTTA  
1801 CGATGCATTT ATTAGGGGTC CACAGACTAA ACTTGTTCCA AAGGTTATGG ATACCAGCAG  
1861 GAAAGTGA CTGATGCTGT TGTT CAGCAG TACCGTGACA CCAAGTTTCC GCTTGATGGG  
1921 TTGCATGTCG ATGTCGACTT TCAGGTAAAT GGCCCAGGTA TCGTTGAAGC TTTGGAGAAT  
1981 GCTAATTGTG CTCGTAAAC TTTAAGGACA ATTT CAGAAC GTTTACC ACT AACC CGATTA  
2041 CGTTCCCTAA TCCCAAAGAA ATGTTTACCA ATCTAAGGAA CAATGGAATC AAGTGTTC CA  
2101 CCAACATCAC CCCTGTTATC AGTATCAGAG ATCGCCCGAA TGGGTACAGT ACCCTCAATG  
2161 AGGGATATGA TAAAAAGTAC TTCATCATGG ATGACAGATA TACCGAGGGG ACAAGTGGGG  
2221 ACCCGCAAAA TGTT CGATAC TCTTTTACG GCGGTGGGAA CCCGGTTGAG GTTAACCC TA  
2281 ATGATGTTTG GGCTCGGCCA GACTTTGGAG ACAATTAGTA AGTTACTCAA TAGGCTACTT  
2341 GAGATATTCT GTAGGTGGCA TTAACACGAC TATAGTGACT TCCCTACGAA CTTC AACTGC  
2401 AAAGACTACC CCTATCATGG TGGTGTGAGT TACGGATATG GGAATGGCAC TGTAAGTGAT  
2461 AATAAGTCAT AAATACAACG TAATTCATGG AGACTAATCA GTGGTAAATG AATTTTAGCC  
2521 AGGTTACTAC CCTGACCTTA ACAGAGAGGA GGTTCTGATC TGGTGGGGAT TGCAGTACGA  
2581 GTATCTCTTC AATATGGGAC TAGAGTTTGT ATGGCAAGAT ATGACAACCC CAGCGATCCA  
2641 TTCATCATAT GGAGACATGA AAGGGTTGCC CACCCGTCTG CTCGTCACCG CCGACTCAGT  
2701 TACCAATGCC TCTGAGAAAA AGCTCGCAAT TGAAAGTTGG GCTCTTTACT CCTACAACCT  
2761 CCATAAAGCA ACCTTCCACG GTCTTGGTCG TCTTGAGTCT CGTAAGAACA AACGTAAC TT  
2821 CATCCTCGGA CGTGGTAGTT ACGCCGGTGC CTATCGTTTT GCTGGTCTCT GGA CTGGAGA  
2881 TAACGCAAGT ACGTGGGAAT TCTGGAAGAT TTCGGTCTCC CAAGTTCTTT CTCTAGGTCT  
2941 CAATGGTGTG TGTATAGCGG GGTCTGATAC GGGTGGTTTT GAGCCCGCAC GTACTGAGAT  
3001 TGGGGAGGAG AAATATTGCA GTCCGGAGCT ACTCATCAGG TGGTATACTG GATCATTCCT  
3061 TTTGCCATGG CTTAGAAACC ACTACGTCAA GAAGGACAGG AAATGGTTCC AGGTAATATA

【図 15】

FIGURE 15 配列

3121 CTCTTTCTGG TCTCTGAGTA TCGAAGACGC TAAGACAATA TAGGAACCAT ACBCGTACCC  
 3181 CAAGCATCTT GAAACCCATC CAGAGCTCGC AGATCAAGCA TGGCTTTACA AATCTGTTCT  
 3241 AGAAATTTGC AGATACTGGG TAGAGCTAAG ATATTCCCTC ATCCAGCTCC TTACGACTG  
 3301 CATGTTCCAA AACGTGGTCG ATGGTATGCC ACTTGCCAGA TCTATGGTAT GCATTTTATC  
 3361 CGTCTCCTTT CACGATAATG CACCAGTCTA ACCGAATTTT CTTTATGCTC TTGACCGATA  
 3421 CTGAGGATAC GACCTTCTTC AATGAGAGCC AAAAGTTCCT CGATAACCAA TATATGGCTG  
 3481 GTGACGACAT CTTGTAGCA CCCATCCTCC ACAGCCGTAA CGAGGTTCGG GGAGAGAACA  
 3541 GAGATGTCTA TCTCCCTCTA TTCCACACCT GGTACCCCTC AAACCTGAGA CCGTGGGACG  
 3601 ATCAGGGAGT CGCTTTAGGG AATCCTGTCG AAGGTGGCAG CGTTATCAAC TACACTGCCA  
 3661 GGATTGTTGC CCCAGAGGAT TATAATCTCT TCCACAACGT GGTGCCGGTC TACATCAGAG  
 3721 AGGGTAAGCG ATGGAATAAT TTCTTGCAAG TTCCAGATAC AAGTGGTTAC TGACACCTTA  
 3781 AACCAGGTGC CATCATTCGG CAAATTCAGG TACGCCAGTG GATTGGCGAA GGAGGGCCTA  
 3841 ATCCCATCAA GTTCAATATC TACCCTGGAA AGGACAAGGT ATATTCTCCA TGACTATCGC  
 3901 GCATTTATTC TTCTCTACT CCACTAACT TCATCTGAAT ATAGGAGTAT GTGACGTACC  
 3961 TTGATGATGG TGTTAGCCGC GATAGTGCAC CAGATGACCT CCCGCAGTAC CGCGAGGCCT  
 4021 ATGAGCAAGC GAAGGTCGAA GGCAAAGACG TCCAGAAGCA ACTTGCGGTC ATTCAAGGGA  
 4081 ATAAGACTAA TGACTTCTCC GCCTCCGGGA TTGATAAGGA GGCAAAGGGT TATACCGCA  
 4141 AAGTTTCTAT CAAACAGGTA CATGATTCA TCTTCCTTTT TTCGCAGTCA CTATTATATC  
 4201 ATCCTAACAT TGCTTCTCTT ATTTAAAAGG AGTCAAAAGA CAAGACCCGT ACTGTCACCA  
 4261 TTGAGCCAAA ACACAACGGA TACGACCCCT CTAAGGAAGT TGGTAATTAT TATACCATCA  
 4321 TTCTTTGGTA CGCACCAGGC TTGACGGCA GCATCGTCCA TGTGAGCCAG GCGACCGTGA  
 4381 ACATCGAGGG CGGGGTGGAA TGCGAAATTT TCAAGAACAC CGGCTTGCAT ACGGTTGTAG  
 4441 TCAACGTGAA AGAGGTGATC GGTACCACAA AGTCCGTCAA GATCACTTGC ACTACCGCTT  
 4501 AGAGCTCTTT TATGAGGGGT ATATGGGAGT GGCAGCTCAG AAATTTGGGA AGCTTCTGGG  
 4561 TATTCCTTTT GTTTATTTAC TTATTTATTG AATCGACCAA TACGGGTGGG ATTCTCTCTG  
 4621 GTTTTTGTGA GGCTATGTTT TACTTGCTCT GAAAATCAAA TTCGTTCTCA

FIGURE 16

MC	- MAGFSOPLNFCKAEDYYSAVALDWKGPQKIIGVDTTPPKSTKFPKNWHGVN	-50
MV	- MAGLSOPLNFCKAEDYAAAKGWSGPQKIIRYDQTTPPQGTDKPKSWHAVN	-50
MC	- LRFDDGTGLGVVQFIRPCVWRVRYPDPGFKTSDEYGDENTRTIVQDYMTSL	-100
MV	- LPFDDGTMCVVQFVRPCVWRVRYPSPVKTSDEYGDENTRTIVQDYMTTLV	-100
MC	- NKLDTYRGLTWETKCEDSGOFFTFSSKVTAVEKSERTRNKVGDLRIHLW	-150
MV	- GNLDIFRGLTWWSTLEDSEYTTFKSEVTAVDETERTRNKVGDLKIYLW	-150
MC	- KSPFRIQVVRTLTPDKPYIPNVAAAARVSDKVWVQTS PKTFRKNLHP	-200
MV	- KNP FRIQV RLL TPLVD PFI PN VAN ATAR VADKV WQTS PKT FRKNL HP	-200
MC	- QHKMLKD TVLDI VKPGHGEYVGWGEMGGIQFMKEPTFMNYFNFDNMQYQQ	-250
MV	- QHKMLKD TVLDI I KPGHGEYVGWGEMGGIEFMKEPTFMNYFNFDNMQYQQ	-250
MC	- VYAQGALDSREPLYHSDFYLDVNSNPEHKNITATFIDNYSQIAIDFGKT	-300
MV	- VYAQGALDSREPLYHSDFYLDVNSNPEHKNITATFIDNYSQIAIDFGKT	-300
MC	- NSGYIKLGTRYGGIDCYGISADTVPEIVRLYTGLVGRSKLKPRYILGAHQ	-350
MV	- NSGYIKLGTRYGGIDCYGISADTVPEIVRLYTGLVGRSKLKPRYILGAHQ	-350
MC	- ACYGYQQESDLYSVVQYRDCKFPLDGIHVQDVQDGFRFTTNPHFTPN	-400
MV	- ACYGYQQESDLHAVVQYRDTKFPLDGLHVQDVQDNFRFTTNPIFTP	-400
MC	- PKEMFTNLNRNGIKCSTNITPVISINNREGGYSTLLEGVDKKYFIMDDRY	-450
MV	- PKEMFTNLNRNGIKCSTNITPVISIRDRPNGYSTLNEGVDKKYFIMDDRY	-450
MC	- TEGTSGNAKDVRMYGGGNKVEVDPNDVNRPDFKONYDFPANFNSKQY	-500
MV	- TEGTSGDPQNVRYSFYGGGNPVEVNPNDVWARPDFGONYDFPTNFCKDY	-500
MC	- PYHGGSYGYGNGSAGFYPD LN RKEVRI WWGMQKYLFDMGLEFWQDMT	-550
MV	- PYHGGSYGYGNGTPGYYPD LN REEVRI WWGLQEYLFNMGLEFWQDMT	-550
MC	- TPAIH TSYGDMKGLPTRLLVTS DSV TNASEKKLA I ET WAL YSYNL HKATW	-600
MV	- TPAIH SSYGDMKGLPTRLLVTS DSV TNASEKKLA I ES WAL YSYNL HKATE	-600

【 図 1 6 】

FIGURE 16 転写

MC - HGLSRLESRKNNRNFILGRGSYAGAYRFAGLWTGDNASNWEFWKISVSQV -650  
 ::: ::  
 MV - HGLGRLESRKNNRNFILGRGSYAGAYRFAGLWTGDNASTWEFWKISVSQV -650  
 MC - LSLGLNGVCIAGSDTGGFEPYRDANGVEEKYCSPPELLIRWYTGSFLLPWL -700  
 ::  
 MV - LSLGLNGVCIAGSDTGGFEPAR-TEIGEEKYCSPPELLIRWYTGSFLLPWL -699  
 MC - RNHYVKKDRKWFQEPYSYPKHLETHPELADQAWLYKSVLEICRYVELRY -750  
 ::  
 MV - RNHYVKKDRKWFQEPYAYPKHLETHPELADQAWLYKSVLEICRYWVELRY -749  
 MC - SLIQLLYDCMFQNVVDGMPITRSMLLTDTEDTFFNESQKFLDNQYMAGD -800  
 ::  
 MV - SLIQLLYDCMFQNVVDGMPILARSMLLTDTEDTFFNESQKFLDNQYMAGD -799  
 MC - DILVAPILHSRKEIPGENRDVYLPLYHTWYPSNLRPWDDQGVALGNPVEG -850  
 ::  
 MV - DILVAPILHSRNEVPGENRDVYLPLFHTWYPSNLRPWDDQGVALGNPVEG -849  
 MC - GSVINYTARIVAPEDYNLFHSVVPVYVREGAIIPQIEVRQWTGQGGANRI -900  
 ::  
 MV - GSVINYTARIVAPEDYNLFHNVPVYIREGAIIPQIQVRQWIGEGGNPI -899  
 MC - KFNIYPGKDKEYCTYLDGVSRSAPEDLPQYKETHEQSKVEGAEIAKQI -950  
 ::  
 MV - KFNIYPGKDKEYVTYLDGVSRSAPDDLQYREAYEQAKVEGKDVQKQL -949  
 MC - G-----KKTGYNISGTDPEAKGYHRKVAVTQTSKDKTRTVTIEPKHNGYD -995  
 : . :: : :::::::::: : ::::::::::::::::::::::  
 MV - AVIQGNKTNDFSASGIDKEAKGYHRKYSIKQESKDKTRTVTIEPKHNGYD -999  
 MC - PSKEVGDDYYTIIILWYAPGFDGSIVDYSKTTVNVEGGVEHQVYKNSDLHTV -1045  
 :::::: :::::::::::::::::::::::::: : :::: : ::::  
 MV - PSKEVGNYTIIILWYAPGFDGSIVDSQATVNIIEGGVECEIFKNTGLHTV -1049  
 MC - VIDVKEVIGTTKSVKITCTAA -1066  
 :. ::::::::::::::::::::  
 MV - VVNVKEVIGTTKSVKITCTTA -1070

【 图 1 7 】

FIGURE 17

MAGFSDPLNF CKAEDYYSVA LDWKGPKII GVDTPPKST KFPKNWHGVN LRFDDGTLGV VQFIRPCVWR  
 VRYDPGFKTS DEYGDENTRT IVQDYMSTLS NKLDTYRGLT WETKCEDSGD FFTFSSKVTA VEKSERTRNK  
 VGDGLRIHLW KSPFRIQVVR TLTPLKDPYP IPNVAAAEAR VSDKVVWQTS PKTFRKNLHP QHKMLKDTV  
LDVNSNPEHK  
 DIVKPGHGEY VGWGMGGIQ FMKEPTFMNY FNFDMQYQQ VYAQGALDSR EPLYHSDPFY  
 NITATFIDNY SQIAIDFGKT NSGYIKLGTR YGGIDCYGIS ADTVPEIVRL YTGIVGRSKL KPRYILGAHQ  
 ACYGYQQESD LYSVVQYRD CKFPLDGIHV DVDVQDGFRT FTTNPHTFPN PKEMFTNLRN NGIKCSTNIT  
 PVISINNREG GYSTLLEGVD KKYFIMDDRY TEGTSGNAKD VRYMYGGGN KVEVDPNDVN GRPDFKDNID  
 FPAFNSKQY PYHGGVSYGY GNGSAGFYPD LNRKEVRIWW GMQYKYLFDN GLEFVWQDMT TPAIHSSYGD  
 MKGLPTRLLV TSDSVTNASE KKLAIETWAL YSYNLHKATW HGLSRLESRK NKRNFILGRG SYAGAYRFAG  
 LWTGDNASNW EFWKISVSQV LSLGLNGVCI AGSDTGGFEP YRDANGVEEK YCSPPELLIRW YTGSLFLPWL  
 RNHYVKKDRK WFQEPYSYPK HLETHPELAD QAWLYKSVLE ICRYVELRY SLIQLLYDCM FQNVVDGMP  
 TRSMLLTDE DTTFFNESQK FLDNQYMAGD DILVAPILHS RKEIPGENRD VYLPLYHTWY PSNLRPWDDQ  
 GVALGNPVEG GSVINYTARI VAPEDYNLFH SVVPVYVREG AIIPQIEVRQ WTGQGGANRI KFNIPGKDK  
 EYCTYLDGV SRDSAPEDLP QYKETHEQSK VEGAEIAKQI GKKTGYNISG TDPEAKGYHR KVAVTQTSKD  
 KTRTVTIEPK HNGYDPSKEV GDYYTIIILWY APGFDGSIVD VSKTTVNVEG GVEHQVYKNS DLHTVVIDVK  
 EVIGTTKSVK ITCTAA

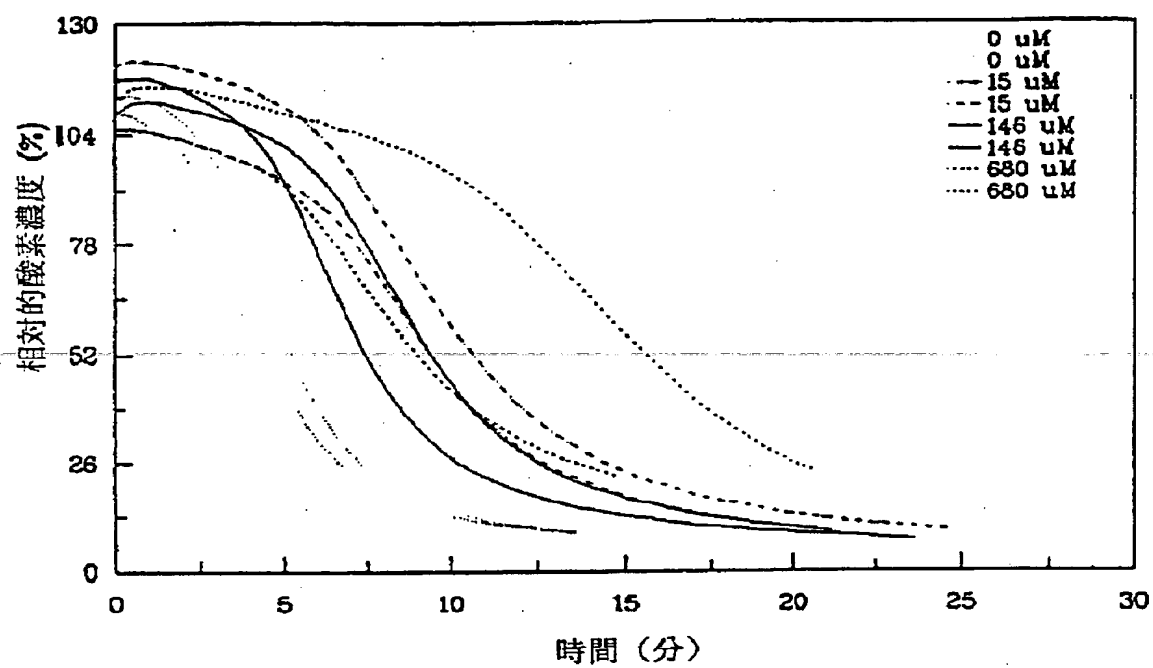
【 图 1 8 】

FIGURE 18

MAGLSPLNF RKAEDYAAAA KGWSGPQKII RYDQTPPQGT KOPKSWHAVN LPFDDGTMCV VQFVRPCVWR  
 VRYDPSVKTS DEYGDENTRT IVQDYMSTLV GNLDIFRGLT WVSTLEDSE YTFKSEVTA VDETERTRNK  
 VGDGLKIYLW KNPRIQVVR LLTPLVDPP IPNVANATAR VADKVVWQTS PKTFRKNLHP QHKMLKDTV  
 DIKPGHGEY VGWGMGGIE FMKEPTFMNY FNFDMQYQQ VYAQGALDSR EPLYHSDPFY LDVNSNPEHK  
 NITATFIDNY SQIAIDFGKT NSGYIKLGTR YGGIDCYGIS ADTVPEIVRL YTGIVGRSKL KPRYILGAHQ  
 ACYGYQQESD LHAVVQYRD TKFPLDGLHV DVDFQDNFRT FTTNPITEPN PKEMFTNLRN NGIKCSTNIT  
 PVISIRDRPN GYSTLNEGYD KKYFIMDDRY TEGTSGDPON VRYSEYGGGN PVEVNPNDVW ARPDFGDNID  
 FPTNFNCKDY PYHGGVSYGY GNGTPGYYPD LNREEVRIWW GLQYEYLFNM GLEFVWQDMT TPAIHSSYGD  
 MKGLPTRLLV TADSVTNASE KKLAIESWAL YSYNLHKATF HGLGRLESRK NKRNFILGRG SYAGAYRFAG  
 LWTGDNASTW EFWKISVSQV LSLGLNGVCI AGSDTGGFEP ARTEIGEEKY CSPPELLIRW YTGSLFLPWL  
 NHYVKKDRKW FQEPYAYPKH LETHPELADQ AWLYKSVLEI CRYWVELRYS LIQLLYDCMF QNVVDGMP  
 RSMLLTDED TTFNESQKE LDNQYMAGDD ILVAPILHSR NEVPGENRDV YLPLFHTWYP SNLRPWDDQG  
 VALGNPVEGG SVINYTARIV APEDYNLFHN VVPVYIREGA IIPQIQVRQW IGEGGNPIK FNIYPGKDE  
 YVTYLDGVS RDSAPDDLPQ YREAYEQAKV EGKDVQKQLA VIQGNKTNDF SASGIDKEAK GYHRKVS  
 ESKDKTRVT IEPKHNGYDP SKEVGNYYTI ILWYAPGFDG SIVDVSQATV NIEGGVECEI FKNTGLHTV  
 VNVKEVIGTT KSVKITCTTA

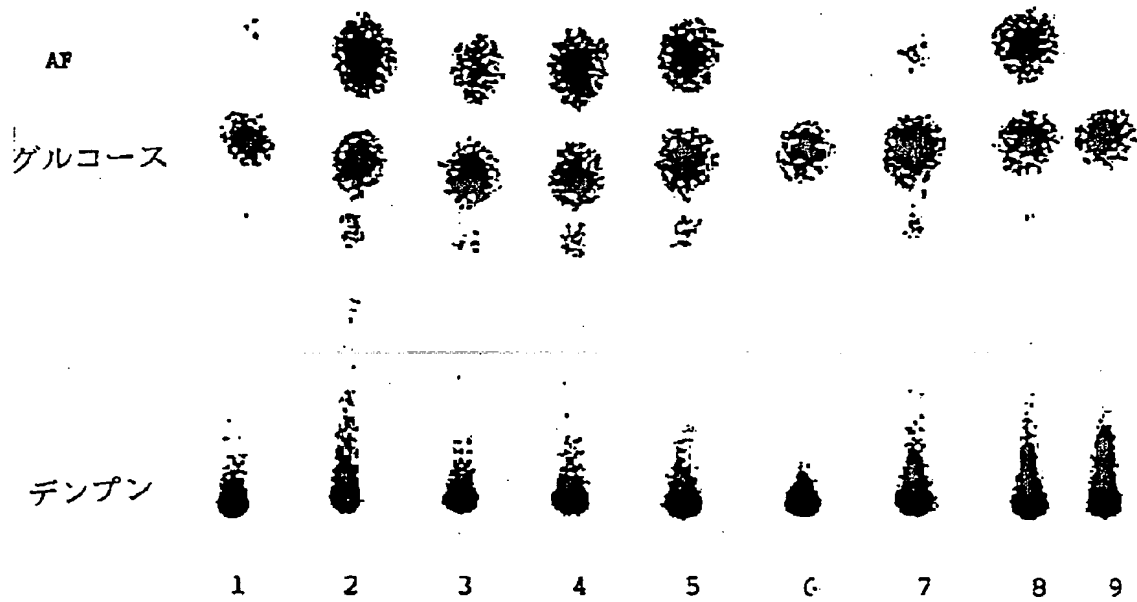
【圖 19】

FIG 19



【 図 2 0 】

Fig 20



## 【 国 際 調 査 報 告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 94/03397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C12N15/60	C12N9/88 C12P19/02 C07H3/10
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N C12P C07H C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 617 502 (SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE) 6 January 1989 cited in the application see page 2, line 13 - page 3, line 26 see page 4, line 7 - line 35 see page 5, line 16 - page 6, line 26 --- -/-	1, 5, 6, 15-17, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 June 1995		29. 06. 95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  Montero Lopez, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 94/03397

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1156, no. 3, 1993 pages 313-320, SHUKUN YU ET AL. 'Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds ' cited in the application see abstract see page 314, left column, paragraph 3 - page 315, left column, paragraph 1 see page 315, right column, paragraph 3 - page 316, right column, paragraph 1	1,6-8
A	BULL. SOC. PHARM. BORDEAUX, vol. 128, no. 1-4, 1989 pages 9-18, MME. M.A. BAUTE ET AL. 'Bioconversions fongiques produisant, à partir de sucres, des composés pyroniques inhabituels à activité antibiotique' see page 13, paragraph 1 - paragraph 8	1,6
A	EP,A,0 177 477 (REGION WALLONNE) 9 April 1986 see page 1, line 10 - line 22	21
P,X	PLANTA, vol. 191, no. 1, 1993 pages 137-142, SHUKUN YU ET AL. 'Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen-degrading enzyme ' see page 137, left column, paragraph 1 see page 137, right column, paragraph 3; figures 4A,B	1,6,7
P,X	WO,A,94 09122 (ALGATECH AB) 28 April 1994  see page 1, line 6 - line 26 see page 2, line 16 - page 3, line 5 see page 3, line 18 - page 5, line 30 see page 8, line 17 - line 25 see page 9, line 1 - line 20 see page 10, line 37 - page 11, line 8 see page 11, line 26 - page 12, line 35 see page 16, line 29 - line 35 see page 28, line 10 - page 30, line 33	1-8, 15-17, 19,21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 94/03397

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 4.4(a).

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.- claims 1-19: 1,4-D-Anhydrofructose and method for its preparation
- 2.- claims 20: Method to increase stability and activity of glucan lyase.
- 3.- claims 21: Use of anhydrofructose as anti-oxidant.
- 4.- claims 22: Use of anhydrofructose as sweetener.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
1-20
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/03397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2617502	06-01-89	NONE	
EP-A-177477	09-04-86	BE-A- 900679	16-01-85
WO-A-9409122	28-04-94	AU-B- 5347094 SE-A- 9203084	09-05-94 22-04-94

## フロントページの続き

- | (51) Int. Cl.  | 識別記号   | 庁内整理番号 | F I |
|----------------|--|--------|-----|
| (C 1 2 N 9/88  |  |        |     |
| C 1 2 R 1:685) |  |        |     |
| (C 1 2 N 9/88  |  |        |     |
| C 1 2 R 1:865) |  |        |     |
| (C 1 2 N 9/88  |  |        |     |
| C 1 2 R 1:90)  |  |        |     |
| (C 1 2 N 9/88  |  |        |     |
| C 1 2 R 1:84)  |  |        |     |
| (31) 優先権主張番号   | 9 3 2 1 3 0 3 . 1  |        |     |
| (32) 優先日       | 1993年10月15日  |        |     |
| (33) 優先権主張国    | イギリス (GB)  |        |     |
| (31) 優先権主張番号   | 9 3 2 1 3 0 4 . 9  |        |     |
| (32) 優先日       | 1993年10月15日  |        |     |
| (33) 優先権主張国    | イギリス (GB)  |        |     |
| (31) 優先権主張番号   | 9 3 2 1 3 0 5 . 6  |        |     |
| (32) 優先日       | 1993年10月15日  |        |     |
| (33) 優先権主張国    | イギリス (GB)  |        |     |
| (81) 指定国       | EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN |        |     |
| (72) 発明者       | クラフ, カーステン マシアス  |        |     |
|                | デンマーク国 ヴィビー ジェイ ディー  |        |     |
|                | ケー-8260, スターブトラブベ 139 エ  |        |     |
|                | イ  |        |     |
| (72) 発明者       | ボジコ, マジャ   |        |     |
|                | デンマーク国 ゲントフテ ディーケー   |        |     |
|                | 2820, フラグトパーケン 11  |        |     |
| (72) 発明者       | ニールセン, ジョン   |        |     |
|                | デンマーク国 コペンハーゲン エス デ  |        |     |
|                | イーケー-2300, エングベ 38   |        |     |
| (72) 発明者       | マーキュセン, ジャン  |        |     |
|                | デンマーク国 コペンハーゲン ケイ デ  |        |     |
|                | イーケー-1210, 2., クナプロストラエ  |        |     |
|                | ド 25   |        |     |
| (72) 発明者       | クリステンセン, トーブ マーテル イー   |        |     |
|                | ダ エルサ  |        |     |
|                | デンマーク国 アレロッド ディーケー   |        |     |
|                | 3450, ソエンゲン 30   |        |     |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**